

**TISSUE POLYPEPTIDE ANTIGEN (TPA) UND  
CARCINOEMBRYONALES ANTIGEN (CEA) IN  
MAMMACARCINOMEN UND IHREN AXILLÄREN  
LYMPHKNOTENMETASTASEN**

**- Vergleichende immunhistochemische Untersuchungen -**

**ULRIKE MEYER**

**1986**



Aus dem Pathologischen Institut der Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. M. Eder

TISSUE POLYPEPTIDE ANTIGEN (TPA) UND CARCINOEMBRYONALES  
ANTIGEN (CEA) IN MAMMACARCINOMEN UND IHREN AXILLÄREN  
LYMPHKNOTENMETASTASEN  
- VERGLEICHENDE IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN -

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Ulrike Meyer  
aus  
München

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Reinhard Bassermann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Max Eder

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Mai 1986

|                                                                                                  | Seite |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1. EINLEITUNG.....                                                                               | 1     |
| 1.1. Mammacarcinome und Lymphknotenmetastasen.....                                               | 1     |
| 1.2. CEA als Tumormarker.....                                                                    | 3     |
| 1.3. TPA als Tumormarker.....                                                                    | 11    |
| 1.4. Mammacarcinome, Lymphknotenmetastasen und<br>Tumormarker: eigene Fragestellung.....         | 14    |
| 2. MATERIAL UND METHODEN.....                                                                    | 15    |
| 2.1. Histologisches Untersuchungsgut und<br>Klassifizierungen.....                               | 16    |
| 2.2. Vorbemerkungen zur Methode.....                                                             | 18    |
| 2.2.1. Methoden.....                                                                             | 19    |
| 2.3. Immunhistochemische Methoden.....                                                           | 20    |
| 2.3.1. Durchführung der indirekten Immunper-<br>oxidase-Methode.....                             | 20    |
| 2.4. Auswertungsmethodik.....                                                                    | 23    |
| 3. ERGEBNISSE.....                                                                               | 29    |
| 1. Auswertung                                                                                    |       |
| 3.1. Der immunhistochemische Nachweis von TPA<br>in Primärtumoren.....                           | 29    |
| 3.1.2. Allgemeiner Reaktionsausfall für TPA in<br>Primärtumoren.....                             | 29    |
| 3.1.3. Färbeintensität für TPA in Primärtumoren<br>in Beziehung zum histologischen Grad.....     | 32    |
| 3.1.4. Färbeintensität für TPA in Primärtumoren<br>in Beziehung zum Tumorstadium.....            | 33    |
| 3.1.5. Färbeintensität für TPA in Primärtumoren<br>in Beziehung zur histologischen Struktur..... | 34    |

|                                                                                                                                                          | Seite |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 3.2. Der immunhistochemische Nachweis von TPA<br>in Metastasen.....                                                                                      | 35    |
| 3.2.1. Allgemeiner Reaktionsausfall für TPA in<br>Metastasen.....                                                                                        | 35    |
| 3.2.1.2. Vergleich der Intensität des Reaktions-<br>ausfalles für TPA in Primärtumoren und<br>Metastasen.....                                            | 36    |
| 3.3. Färbeintensität für TPA in Metastasen in<br>Beziehung zum histologischen Grad.....                                                                  | 37    |
| 3.3.1. Vergleich der Intensität des Reaktionsaus-<br>falls für TPA in den Primärtumoren und<br>Metastasen in Beziehung zum histologischen<br>Grad.....   | 40    |
| 3.4. Färbeintensität für TPA in Metastasen in<br>Beziehung zur Stadienbestimmung der Pri-<br>märtumoren.....                                             | 41    |
| 3.5. Färbeintensität für TPA in Metastasen in<br>Beziehung zur histologischen Struktur.....                                                              | 43    |
| 3.5.1. Vergleich der Intensität des Reaktions-<br>ausfalls für TPA in Primärtumoren und Me-<br>tastasen in Beziehung zur histologischen<br>Struktur..... | 45    |
| 3.6. Der immunhistochemische Nachweis von CEA<br>in Primärtumoren.....                                                                                   | 46    |
| 3.6.1. Allgemeiner Reaktionsausfall für CEA in<br>Primärtumoren.....                                                                                     | 46    |
| 3.6.2. Färbeintensität für CEA in Primärtumoren<br>in Beziehung zum histologischen Grad.....                                                             | 48    |

# III

|                                                                                                                                                                      | Seite |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 3.6.3. Färbeintensität für CEA in Primärtumoren<br>in Beziehung zum Tumorstadium.....                                                                                | 49    |
| 3.6.4. Färbeintensität für CEA in Primärtumoren in<br>Beziehung zur histologischen Struktur.....                                                                     | 50    |
| 3.7. Der immunhistochemische Nachweis von CEA<br>in Metastasen.....                                                                                                  | 52    |
| 3.7.1. Allgemeiner Reaktionsausfall für CEA in<br>Metastasen.....                                                                                                    | 52    |
| 3.7.2. Vergleich der Intensität des Reaktions-<br>ausfalls für CEA in Primärtumoren und Me-<br>tastasen.....                                                         | 53    |
| 3.7.3 Färbeintensität für CEA in Metastasen in<br>Beziehung zum histologischen Grad.....                                                                             | 53    |
| 3.7.3.1. Vergleich der Intensität des Reaktionsaus-<br>falls für CEA in Primärtumoren und Meta-<br>stasen in Beziehung zum histologischen<br>Grad.....               | 56    |
| 3.8. Färbeintensität für CEA in Metastasen in<br>Beziehung zur Stadienbestimmung der Pri-<br>märtumoren.....                                                         | 57    |
| 3.8.1. Vergleich der Intensität des Reaktionsaus-<br>falls für CEA in Primärtumoren und Metasta-<br>sen in Beziehung zur Stadienbestimmung der<br>Primärtumoren..... | 58    |
| 3.9. Färbeintensität für CEA in Metastasen in<br>Beziehung zur histologischen Struktur.....                                                                          | 59    |
| 3.9.1. Vergleich der Intensität des Reaktionsaus-<br>falls für CEA in Primärtumoren und Meta-<br>stasen in Beziehung zur histologischen<br>Struktur.....             | 62    |

|                                                                                                                                         | Seite |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 3.10. Überblick über Homogenitäten bzw. Heterogenitäten des immunhistochemischen Reaktionsausfalls in Primärtumoren und Metastasen..... | 64    |
| 3.10.1. Überblick über Homogenität bzw. Heterogenität bei Primärtumoren im Färbemuster für TPA.....                                     | 65    |
| 3.10.2. Homogenität bzw. Heterogenität in Primärtumoren für TPA in Beziehung zum Grading.....                                           | 65    |
| 3.10.3. Homogenität bzw. Heterogenität in Primärtumoren für TPA in Beziehung zum Staging.....                                           | 67    |
| 3.10.4. Homogenität bzw. Heterogenität in Primärtumoren für TPA in Beziehung zur histologischen Struktur.....                           | 67    |
| 3.11. Homogenität bzw. Heterogenität in Metastasen für TPA.....                                                                         | 68    |
| 3.11.1. Homogenität bzw. Heterogenität in Metastasen für TPA in Beziehung zum Grading und Staging.....                                  | 68    |
| 3.12. Homogenität bzw. Heterogenität bei Primärtumoren und Metastasen-Ausfall für CEA.....                                              | 69    |
| 4. DISKUSSION.....                                                                                                                      | 73    |
| 5. ZUSAMMENFASSUNG.....                                                                                                                 | 90    |
| 6. LITERATURVERZEICHNIS.....                                                                                                            | 94    |

## 1. EINLEITUNG

### 1.1. Mammacarcinome und Lymphknotenmetastasen

Das Mammacarcinom nimmt unter den vielen malignen Tumoren eine besondere Stellung ein, weil es das häufigste Carcinom der Frau mit steigender Mortalitätsstatistik in den westlichen Ländern ist.

Die Inzidenz liegt bei etwa 70 Mammacarcinomen auf 100000 Frauen, wobei nach der Menopause das Risiko für das Auftreten eines Mammacarcinoms ansteigt. 80 % der Mammacarcinome treten in der Altersgruppe zwischen 35 und 75 Jahren auf. Ein weiterer Grund für die Sonderstellung des Mammacarcinoms sind Hinweise, die darauf deuten, sei es aus dem Metastasierungsverhalten (Eder 1984), sei es aus dem klinisch biologischen Verhalten (Nagel 1985), daß es sich hierbei um verschiedene, biologisch unterschiedliche Krebsformen handeln muß.

Man kennt zwar seit langem zwei histogenetische Grundtypen, das duktale und das lobuläre Carcinom, die sich etwa anhand des unterschiedlichen Metastasierungsmusters (Harris 1984) unterscheiden lassen, doch ist die Variabilität der invasiven dukталen Carcinome, der Hauptgruppe mit etwa 70 % aller Mammacarcinome (Azzopardi 1979), so groß, daß gerade bei dieser Tumorgruppe die Suche nach prognostischen Parametern im Mittelpunkt des Interesses steht. Zwar können einzelne histologisch morphologisch charakteristische Sonderformen mit biologisch abweichendem Verhalten, wie das medulläre Mammacarcinom mit lymphoidzelliger Randreaktion abgegrenzt werden, diese Sonderform hat trotz ihres hohen Mitosereichtums und ihrer Kernpolymorphie sowie ihrer undifferenzierten Wachstumsstruktur eine bessere Prognose als die anderen dukталen Mammacarcinome, doch steht eine befriedigende Gliederung dieser Gruppe von Mammacarcinomen noch aus, die mit entsprechenden unterschiedlichen biologischen Verläufen korreliert.

Zahlreiche prognostische Parameter sind deshalb auf ihre Bedeutung hin geprüft worden und haben längst Eingang in die Alltagsdiagnostik gefunden. Dies gilt für die Stadienbestimmung, z.B: die Bestimmung der Tumorgröße erfaßt im TNM-Schema der UICC, der histologischen Typisierung der WHO und dem histologischen Grading nach Bloom und Richardson (1957) bei dem eine kombinierte Bewertung von Struktureigenschaften wie Drüsenbildung und zellulären Merkmalen wie Polymorphie und Mitosehäufigkeit bestimmt werden. Auch die Hormonrezeptorbestimmung hat in den letzten Jahren allgemeine Verbreitung und Anwendung gefunden. Bei der Suche nach weiteren z.T. sich ergänzenden, z.T. aber von einander unabhängigen prognostischen Parametern und Unterscheidungsmerkmalen haben die moderne Technik der immunhistochemischen Nachweisverfahren, sei es zum Nachweis onkofetaler Antigene, sei es zum Nachweis unterschiedlich differenzierter Cytoskelettstrukturen Bedeutung gewonnen.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb, Mammacarcinome vergleichend mit entsprechenden immunhistochemischen Methoden zu untersuchen.

Ein anderer Ansatz der hier vorliegenden Arbeit betrifft die parallel hierzu durchgeführte analoge Untersuchung der zugehörigen Lymphknotenmetastasen. Ausgangspunkt dieser Miteinbeziehung der zugehörigen Lymphknotenmetastasen war die bekannte Tatsache, daß bösartige Primärtumoren in der Regel in ihren Metastasen die histologische Struktur des Primärtumors mehr oder weniger weit nachahmen, wenngleich es immer wieder Beobachtungen gibt, in denen auch ein Differenzierungsverlust in Metastasen zum Vorschein kommt. Diese bereits von Willis (1973) getroffene Feststellung ist insofern überraschend, als in der Zwischenzeit experimentelle Untersuchungen eine z.T. erhebliche Heterogenität von Tumorzellpopulationen zwischen Primärtumor und Metastasen erwiesen haben (Fidler und Hart 1982).

Die Bedeutung clonaler Selektionsprozesse bei dem Vorgang

der Metastasierung wird in diesen Untersuchungen, allerdings an bestimmten experimentellen Tumormodellen, herausgestellt. Mit der vergleichenden immunhistochemischen Analyse von Primärtumoren und Metastasen sollte damit gleichzeitig in der vorliegenden Arbeit ein Beitrag zu diesem hier aufgezeigten Metastasierungsproblem geleistet werden.

Eine derartige vergleichende immunhistochemische Untersuchung und Analyse sowohl in Primärtumoren als in den dazugehörigen Lymphknotenmetastasen erschien uns umso notwendiger, als zum Zeitpunkt des Beginns dieser Untersuchung, aber auch noch zum Zeitpunkt der ersten Veröffentlichung der hier niedergelegten Ergebnisse (Nathrath, Meyer, Bassermann, 1984) keine vergleichbare Analyse bekannt war.

### Vorbemerkungen

#### 1.2. CEA als Tumormarker

In Hinblick auf die nachfolgende immunhistochemische Anwendung von CEA als einen für die vorliegende Untersuchung von Mammacarcinomen und ihren Lymphknotenmetastasen besonders interessanten Marker erscheinen einige kurze Vorbemerkungen nötig.

Gold und Freedman beschrieben 1965 ein Glykoprotein, das sie aus Extrakten von Kolontumoren mit Agradiffusion immunologisch nachweisen konnten. Sie verwendeten ein Antiserum, das in Kaninchen gegen Kolontumorextrakte hergestellt war und mit Extrakten aus normaler Darmschleimhaut absorbiert wurde.

Der Nachweis gelang in Neoplasien bei Organen des Gastrointestinaltraktes endodermalen Ursprungs, wobei die Konzentrationen im cranialen Teil, Ösophagus, Magen, Pankreas und Leber, niedriger waren als im caudalen Teil des Gastrointestinaltraktes, Colon und Rectum.

Organe ectodermalen Ursprungs wie Mundhöhle und Parotis blieben ohne Nachweis von CEA.

Die unterschiedliche Verteilung der Konzentrationen bei endo- und ectodermalen Organen wies auf eine mögliche Korrelation zwischen der Synthese dieses Antigens und der Entwicklung des Gastrointestinaltraktes hin, woraufhin die Autoren untersuchten, ob dieses Antigen in embryonalen bzw. fetalen Gewebe vorkommt. Sie fanden es in Embryonen bzw. Feten bis zum 6. Gestinonsmonat im Darm, Pankreas und Leber.

Dieses homologe Vorkommen in Feten und Neoplasien bei Erwachsenen brachte die Bezeichnung "Carcinoembryonales Antigen"-CEA.

Heute allerdings weiß man, daß CEA während des gesamten intrauterinen Lebens vorkommt, erhöhte CEA-Serumspiegel finden sich noch kurz nach der Geburt und winzige Spuren in jedem nicht krebskranken Menschen, in der normalen Lunge mit den höchsten Konzentrationen (Wagener 1977), CEA ist eine frei im Serum zirkulierende, fast in jedem epithelialen Gewebe vorkommende Substanz, deren Nachweis allerdings sensibler immunologischer Nachweismethoden bedarf (Thomsen 1969, Wagener 1977). CEA ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 200.000-250.000 Dalton, das in 0,6 mol/l Perchloridsäure löslich ist, dank seines hohen Gehalts an Kohlehydraten.

Ein weiterer Bestandteil sind Asparagin, Prolin und Glutamin, die zu den häufig vorkommenden Aminosäuren gehören (Hammerström 1975, Coligen 1975, Rogers 1976, Primus 1983).

Nachfolgende Untersuchungen zeigten, daß es Antigene gibt (v. Kleist 1973), die mit CEA kreuzreagieren, d.h. mit anti-CEA Antikörpern reagieren können, das liegt daran, daß sie mit CEA teildentisch sind; das wohl bekannteste unter diesen kreuzreagierenden Antigenen ist das "non-specific cross reacting antigen", NCA, das weder tumor- noch organspezifisch ist. Es unterscheidet sich von CEA durch ein geringeres Molekulargewicht und unterschiedliche Antigen-Determinanten an seinem Molekül, wobei die Kohlehydratanteile des NCA wohl für die Kreuz-

reaktion zu CEA verantwortlich sind (v. Kleist 1969, 1972, 1973). Das Vorkommen wird in vielen normalen Geweben, Plasma und besonders in normaler Lunge und Milz beschrieben, als auch in Carcinompatienten (v. Kleist 1976).

Die Konzentration von NCA ist in gesunden Personen etwa 50 mal höher als CEA (Wagener 1977, Burtin 1978). Weitere Antigene, die mit CEA Kreuzreaktionen geben können, sind Galleproteine und Blutgruppensubstanzen. Für die vorliegende immunhistochemische Arbeit an Mammacarcinomen und ihren Lymphknotenmetastasen spielen die zuletzt genannten kreuzreagierenden Substanzen wie Galleproteine und Blutgruppensubstanzen keine Rolle, sehr wohl dagegen NCA.

Es ist deshalb von besonderer Bedeutung, daß für den immunhistochemischen Nachweis für CEA Antiseren verwandt werden, bei denen eine Mitreaktion bzw. Kreuzreaktion zu NCA eben durch Absorbtion mit Organen mit hohem NCA-Gehalt wie Lunge- und Milzextrakte vermieden wird.

Eine Vielzahl von Untersuchungen über maligne Erkrankungen liegt über CEA vor, das nach seinem Übertritt in das Serum vor allem für klinische und therapeutische Studien von besonderem Interesse in seinem Verhalten ist, wie in Colon-, Rectum-, Lungen-, Pankreas- und Magentumoren (Hansen et al. 1974).

Über die Normalverteilung des CEA im Serum ist bekannt, daß es sich um eine frei im Serum zirkulierende Substanz handelt, die praktisch in allen Körperflüssigkeiten und normalen, epithelialen Geweben, wie auch in Faeces in minimalen Konzentrationen nachgewiesen werden kann (Wagener 1977, Miyazaki 1982).

Bei einer großen Zahl von Untersuchungen über CEA-Serumspiegel bei nicht metastasiertem Mammacarcinom fanden sich zum einen normale Serumwerte (Steward 1980), zum anderen wurde aber auch über erhöhte Werte in 27 - 55 % (Jakesz 1979, Haagensen 1978, Lamerz 1979) der Fälle berichtet. Bei metastasiertem Mammacarcinom fanden sich dagegen in bis

zu 80 % der Fälle erhöhte Serumspiegel (Lo Gerfo 1971, Laurence 1972, Mac Sween 1972, Reynoso 1972, Chu 1973, Steward 1974, Lamerz 1975, Tormey 1975, 1977, 1978, Falkson 1978, Myers 1978, Neville 1978, Goldenberg 1981). Da das Mammacarcinom zu den Malignomen zählt, die durch Chemotherapie, Radiatio und Hormontherapie zu behandeln sind, ist es wichtig zu wissen, daß im klinischen Verlauf der Krankheit (Laurence 1972, Chu 1973, Steward 1974, Gold 1978, Falkson 1978, Lamerz 1979) niedrige Werte einer kompletten Remission oder einem Ansprechen auf Therapie, fluktuierende Werte dem stationären Verlauf, hohe Werte der Progression der Krankheit, u.a. einer Metastasierung oder einem Nichtansprechen auf Therapie entsprechen können. Korrelationen fanden sich zwischen Tumormasse und Ausbreitung sowie zirkulierendem CEA (Steward, Falkson), weiterhin zwischen den verschiedenen Stadien und der CEA-Serumkonzentration sowie eines höheren Risikos auf Rezidiv bei hohen postoperativen Werten (Wang 1975, v. Kleist 1979). Keine Beziehung und kein Unterschied zwischen nicht metastasiertem Primärtumor und metastasiertem Tumor, Stadium, Lymphknotenmetastasen fand sich hingegen in anderen Arbeiten (Jakesz 1979). Generell läßt sich sagen, daß die CEA-Serumwerte bei Mammacarcinomen niedriger sind als bei Colontumoren, auch läßt sich keine gute Korrelation zwischen Tumorgewebegehalt und CEA-Serumspiegel in den quantitativen Untersuchungen nachweisen (v. Kleist 1981).

Bei hohen CEA-Serumwerten kann praktisch immer ein metastasiertes Mammacarcinom vorliegen. Von biologischem Interesse ist die Beziehung zwischen CEA-Werten und der Lokalisation von Organmetastasen, die bei Lebermetastasen (Chu) und Knochenmetastasen (Chu, Tormey) höher liegen, als bei Lymphknotenmetastasen und Lungenmetastasen oder Weichteilmastasen, die sehr niedrige Werte zeigen (Tormey, Lamerz).

Die immunhistochemische Normalverteilung von CEA in normaler Colomukosa konnte von Denk (1973) und Primus (1975)

und Goldenberg (1976), nicht, oder nur in geringen Mengen nachgewiesen werden.

Andere Autoren hingegen konnten CEA immer in der normalen Darmmukosa nachweisen, besonders in der normalen Mukosa bei Epithelien von Oberflächen (Heydermann 1977), sowie von Drüsenlumina (Burtin 1972).

Wagner (1983) wies nach, daß die positive Färbereaktion der colorektalen Mukosa während der embryonalen und frühen fetalen Entwicklung zunimmt, aber während der späteren Entwicklung relativ konstant bleibt. Er, wie auch andere Autoren (Goldenberg 1978) konnten CEA während der embryonalen und frühen fetalen Entwicklung außer im Epithel des Ösophagus, Magens, Darms und der Leber in keinem anderen Organ nachweisen. Wagner wies weiterhin nach, daß CEA im Färbemuster und Intensität im Gewebe mit hoher Proliferationsrate wechselt (1978), wobei der Zusammenhang der unterschiedlichen zellulären Anfärbung mit hoher proliferativer Aktivität und Dysplasie ungeklärt ist.

Bei normaler Mamma ließ sich CEA immunhistochemisch in hyperplastischen Epithelien, nekrotischem Cysteninhalte und Granula in Drüsen-Acini und Duktuli nachweisen (Shousha 1978, Nathrath 1984). Andere Autoren konnten in normalem Brustdrüsengewebe kein intrazelluläres CEA nachweisen (Wahren 1978, Walker 1980).

Arbeiten über den immunhistochemischen Nachweis von CEA in Mammacarcinomen fallen in den Ergebnissen sehr unterschiedlich aus. Fälle mit positivem Nachweis von CEA werden angegeben, jedoch schwankt die Angabe über positive wie negative Ergebnisse stark, auch hier möglicherweise bedingt, wie beim Nachweis von CEA im Serum, durch kreuzreagierende Antigene zu CEA, nicht spezifische Seren, bzw. zu hohe Konzentrationen der benutzten Antiseren. In den ersten Untersuchungen zum immunhistochemischen Nachweis in Mammacarcinomen berichtete Goldenberg über den vollständig negativen Ausfall (Goldenberg 1976) der

untersuchten Fälle. Derselbe Autor berichtet (1978), daß unter 62 untersuchten primären Mammacarcinomen ein Fall positiv reagiert habe. Zu ganz anderen Ergebnissen kommt Shousha (1978) in einer Untersuchung, bei der nun über die Lokalisation aber auch die Art der aufgetretenen immunhistochemischen Antigendarstellung genau berichtet wird. Shousha fand in 49 von 74 Fällen (66 %) einen positiven Ausfall für CEA. Von besonderem Interesse in dieser Untersuchung ist, daß von den 49 immunhistochemisch CEA-positiven Primärtumoren 19 Lymphknotenmetastasen hatten, die gleichfalls untersucht wurden, und es zeigte sich, daß alle 19 Lymphknotenmetastasen CEA-positiv ausfielen. Da Shousha in seiner Untersuchungsserie Lymphknotenmetastasen nur bei CEA-positiven Mammacarcinomen fand, schloß er auf eine Korrelation zwischen CEA-Reaktion und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen. Zu einer gegenteiligen Meinung kamen Walker (1980) und v. Kleist (1981). Weitere Untersuchungen beziehen sich auf den Reaktionsausfall für CEA in Primärtumoren zu verschiedenen anderen Tumorcharakteristika. So fanden weder Shousha noch Mansour (1980) eine Korrelation zwischen Tumorgröße und Intensität des immunhistochemischen CEA-Nachweises. Mansour fand weiterhin keine Beziehung zwischen der Reaktionsfähigkeit von CEA und den histologischen Bautypen der Mammacarcinome. Diese Aussage wird auch von Wahren (1978), Walker (1980) und v. Kleist (1981) bestätigt. Dagegen sieht Walker zwischen der CEA-Reaktion und dem histologischen Grad, bestimmt als cytologisches Grading, insofern eine Beziehung, als Mammatumoren von dem histologischen Grad I stärker reagieren als Tumoren des histologischen Grad III. Insgesamt findet sich in den erwähnten Arbeiten von Walker und Wahren, daß 45 von 90 Fällen (50 %), bzw. 21 von 50 Fällen (42 %) einen positiven Nachweis von CEA im Primärtumor der Mammacarcinome aufweisen. Die vergleichbaren Angaben an Arbeiten von Kleist zeigen, daß in 90 von 108 Fällen bei Mammacarcinomen (90 %) positive Reaktionen für CEA erhoben wurden, in diesen Arbeiten, wie auch in den

Untersuchungen von Björklund und v. Kleist (1982) findet sich keine Histologie der untersuchten Fälle. Björklund und v. Kleist (1982) fanden, daß alle von ihren untersuchten 32 Primärtumoren der Mamma (100 %) positiv waren. Die Ergebnisse der eigenen vergleichenden Untersuchung über Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen in ihrem Verhalten beim Nachweis von CEA, über die hier ausführlich berichtet wird, sind erstmals 1984 berichtet und veröffentlicht worden. Zum gleichen Zeitpunkt schreibt Wittekind (1984) über eine ähnliche Untersuchung; er fand in 38 von 48 Fällen (77 %) eine immunhistochemisch positive CEA-Reaktion in Primärtumoren, während in Metastasen nur 34 von 48 Fällen (71 %) positiv reagierten.

In einer jüngst erschienen Untersuchung berichtet Böcker (1985) in 50 % der Mammacarcinome über die positive immunhistochemische Reaktion für CEA. Er zeigte eine Korrelation zwischen CEA-Positivität und dem histologischen Tumortyp, wobei infiltrative duktale Carcinome eine stärkere, bzw. häufigere positive CEA-Reaktion aufwiesen als Tumoren mit tubulären Strukturen, die negativ angegeben werden; eine Beobachtung, die mit Untersuchungen von Shousha übereinstimmt.

Gleichfalls negativ sind, nach den Untersuchungen von Böcker, Mammacarcinome mit cribriformen Baumuster, sowie infiltrativ wachsende lobuläre Carcinome. Im Gegensatz zu Walker berichtet Böcker, daß bei Vorliegen des histologischen Grads III 90 % seiner Fälle positiv reagierten, beim histologischen Grad I dagegen nur noch 40 - 45 %. Wie Shousha berichtet Böcker über eine Korrelation zwischen CEA und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen.

Nur bei einem Teil der Arbeiten, die bisher zitiert worden sind und die, wie dargestellt, zum Teil zu fast kontroversen Ergebnisse geführt haben, werden genauere

Angaben über den histologischen, bzw. cytologischen Reaktionsausfall gegeben. So beschreibt Shousha (1978), daß der immunhistochemische CEA-Nachweis sich als feine Granulationen darstellen kann oder manchmal mit linearer Anordnung entlang der Zelloberfläche und den drüsigen Arealen von Acini und Duktuli. Berichtet wird hierbei, daß die Reaktionsintensität und Reaktionsstärke variiert, wobei abschnittsweise in Carcinomen neben starker Färbintensität invadierender Tumoranteile auch negative Areale vorliegen können. Walker berichtet, daß CEA in der luminalen Peripherie tubulärer Strukturen positiv ausfallen kann; wie oben schon dargestellt, weist Böcker darauf hin, daß er keine positive Reaktion in tubulären Strukturen gefunden habe und daß in Arealen mit solider Tumorformierung eine diffuse intracytoplasmatische Anfärbung beobachtet werden könne. Intrazelluläre CEA-Reaktionen wurden auch in anderen Arbeiten (v. Kleist 1981) berichtet, wobei auch hier die positiven Reaktionen und ihre Intensität innerhalb eines Tumors schwankten, so daß sowohl v. Kleist als auch Wahren angeben, intensiv reagierende Tumorzellen neben morphologisch völlig gleichartigen Zellen zu beobachten. Intraduktal gelegene Nekrosen waren auch in diesen Arbeiten zumeist positiv beschrieben.

### 1.3. TPA als Tumormarker

Die Arbeiten über TPA begannen 1957 mit dem Ziel, ein gemeinsames tumor-spezifisches Antigen nachzuweisen (Björklund 1957), weshalb TPA von Björklund damals als Tumor-Polypeptid Antigen bezeichnet wurde. Daher ist es verständlich, daß, da dieses gleiche Antigen auch im Serum nachweisbar ist, zunächst sich klinische Anwendung (Menendez-Botet 1978, Holyoke 1979, Nemoto 1979), dann auch morphologische Arbeiten (Björklund 1979, 1982) überwiegend auf Tumoren konzentrierten. Dabei konnte gezeigt werden, daß höhere Serum-Konzentrationen von TPA sich in Carcinomen nachweisen ließen als in Sarkomen (Skryten 1981). Erhöhte Serumwerte fanden sich auch bei nicht malignen Erkrankungen (Holyoke 1979).

Als Normalverteilung im Serum beschrieb Björklund (1976) TPA in allen Körperflüssigkeiten, in menschlicher Plazenta, in Amnionflüssigkeit, Muttermilch und sich multiplizierender Zellen.

Arbeiten über den Serumspiegel bei Mammacarcinomen zeigen eine Proportionalität zwischen Stadium der Erkrankung und der Höhe des TPA-Gehaltes, z.B. zeigten sich im Stadium IV mit Hautinfiltration und Fernmetastasen 70 - 90 % der Fälle mit erhöhten Serumwerten, deutlich höheren Werten als im Stadium I bis III ohne Progression der Erkrankung (Menendez-Botet 1978, Kjellgren 1979, Nemoto 1979, Lüthgens und Schlegel 1980, 1983, Moss 1983). Skryten (1981) dagegen findet 64 % der Fälle mit erhöhtem TPA-Spiegel bei metastasierten Mammacarcinomen, bei dieser Arbeit finden sich keine Angaben über Tumorstadien.

Bei Primärtumoren und regionären Lymphknotenmetastasen, Stadium I bis III und stabilem Verlauf sind 40 - 60 % der Fälle im Serum mit erhöhten TPA-Werten zu finden (Nemoto 1979, Menendez-Botet 1978). In keiner dieser Arbeiten gibt es Angaben über Histologie.

Bevor nun eigentlich bekannt war, was TPA eigentlich darstellt, ist aus dem Verteilungsverhalten und Auftreten von TPA, z.B. in Tumoren, immer wieder in unterschiedlicher Weise angenommen worden, daß es sich mehr um ein im Rahmen von Proliferation auftretendes Antigen handelt (Proliferationsantigen) (Björklund 1982). Als sich in der Folgezeit herausstellte, daß TPA aber nicht als tumorspezifisch angesehen werden konnte, sondern nur quantitative Unterschiede im Antigen-Serumkonzentrationen verschiedener epithelialer Tumoren erkennbar war, bekam es immerhin Bedeutung als tumor-assoziiertes Antigen (Björklund 1973, 1981, Skryten 1981, Oehr 1981, Lüthgens 1983).

Histologisch fand sich jedoch kein Nachweis von TPA in schnellproliferierenden, undifferenzierten und unreifen, embryonalen Teratomzellen (Löhrs 1983), aber Ausdruck von Differenzierungsvorgängen und es wurde somit als epitheliales Differenzierungsantigen bezeichnet (Boyse et al. 1969, Nathrath 1982, Löhrs 1983), unterstützt durch den Nachweis besonders in drüsigen Strukturen.

Einen ganz neuen Aspekt bekam die Interpretation, was mit diesem Antigen nachgewiesen wurde, durch Untersuchungen von Nathrath (1983, 1985), in denen in ausführlichen immunhistochemischen Untersuchungen gezeigt wurde, daß TPA im Cytoplasma aller einfachen und geschichteten, nicht verhornten Epithelien vorkommt, nicht dagegen in der Epidermis, in den proximalen Nierentubuli, den Tubuli des Hodens und ebenso nicht in myoepithelialen Zellen, Drüsenacini, etwa im Pankreas und den Hepatocyten. Damit zeigte TPA aber ein Verteilungsmuster, biochemische Eigenschaften und ein Vorkommen, wie es bei einer Reihe von epithelialen Intermediärfilamenten (Caselitz 1981) zu beobachten ist, (Geisler und Weber 1982, Weber und Geisler 1982, Nathrath 1982) wobei insbesondere die Verteilungsähnlichkeit mit bestimmten Cytokeratinen wie den Cytokeratinen 8 und 18 (Moll

1982, Nathrath 1983) auffiel, vor allem aber eine Zell- und Gewebsspezifität, die auch bei maligner Umwandlung dieser Gewebe beibehalten wurde (Nathrath 1983, Geisler und Weber 1982, Geisler 1983). Dementsprechend konnten Nathrath et al. bei der Untersuchung von 40 Mammacarcinomen positive Reaktionen beobachten.

Durch chemische Untersuchungen war bis dahin bekannt, daß TPA B1 eine unverzweigte Peptidkette mit einem Molekulargewicht von 43000 Dalton und einem pI von 4,4 - 4,6 ist, extrahiert aus einem Pool epithelialer Tumoren (Björklund 1957), gezüchteten HeLa-Zellen, Bronchiuscarcinomen und normalem Plazentagewebe. TPA ist frei von Kohlehydraten, Lipiden und prosthetischen Gruppen und besteht nach Aminosäureanalyse aus 380 Aminosäureresten (Lüning 1980). Elektrophoretisch zeigt sich eine  $\alpha_2$  Beta-Mobilität, der Großteil des Moleküls weist eine Alpha-Helix-Struktur auf.

Erst in einer biochemischen Gruppenarbeit untersuchten Weber, Osborn, Moll und Lüning (1984) TPA und konnten zeigen, daß dieses Antigen den Cytokeratinen 8, 18 und 19 zuzuordnen ist, die sich typischerweise in drüsigen, normalen und neoplastischen epithelialen Strukturen (Moll 1982) finden.

Dieses ursprünglich als tumor-spezifisch (tumor-assoziiert) bezeichnete Antigen trägt heute zu Recht den Namen "Tissue Polypeptide Antigen"-TPA und ist offenbar ein mit Cytokeratinen identisches Antigen.

Gerade das Vorkommen dieses Antigens in den Drüsenstrukturen der Mamma legt es nahe, parallel zum immunhistochemischen Nachweis von CEA auch dieses Antigen in seiner genauen Verteilung in Primärtumoren und Metastasen in dieser vorliegenden Arbeit zu überprüfen.

Bereits vorliegende Arbeiten über den Nachweis von TPA, allerdings nur in Primärtumoren, ist in 14 untersuchten Fällen (Björklund 1979), die alle positiv in ihrer Reaktion für TPA ausfielen, beschrieben. Das Ziel der Arbeit war, die Lokalisation von TPA zu bestimmen. Stärkste

Farbreaktion zeigte sich an der Plasmamembran, eine etwas schwächere Reaktion im Cytoplasma, wobei Tumorzellen deutlich stärkere Reaktion zeigten als umgebendes, nicht carcinomatöses Gewebe. Bei einem negativen Fall von 32 untersuchten Mammacarcinomen, in denen sich die meisten Zellen epithelialen Ursprungs färbten, zeigten sich jedoch Abschnitte innerhalb eines Tumors, die negativ blieben. TPA konzentrierte sich in einigen Fällen um den Zellkern und am Cytoplasmarand. Nekrotische Areale blieben negativ (Björklund 1982).

In keiner der zitierten Arbeiten gab es Angaben über die Histologie der untersuchten Mammacarcinome.

#### 1.4. Mammacarcinome, Lymphknotenmetastasen und Tumormarker: eigene Fragestellung

Daraus ergaben sich für die Arbeit folgende Fragen:

1. Welche immunhistochemischen Befunde sind bei Nachweis von CEA an Primärtumoren zu erheben und wie verhalten sich die Tumorzellen in der zugehörigen Lymphknotenmetastase der selben Primärtumoren?
2. Welche Befunde vergleichend wiederum zeigen sich an Primärtumoren und ihren zugehörigen Lymphknotenmetastasen beim Nachweis des TPA (Björklund 1957) nachdem inzwischen, wie berichtet, festgestellt wird, daß es sich hierbei um den Antigennachweis von assoziierten Proteinen zu den Intermediärfilamenten der Cytokeratine 8, 18 und 19 handelt?
3. Zeigt der Vergleich, einerseits eines carcinoembryonalen Antigens und andererseits eines mit Cytoskelettbestandteilen assoziierten Antigens Unterschiede etwa gegenläufig, nachdem es sich um zwei biologisch ganz verschiedene Antigenarten handelt; lassen sich weiterhin aus dem Verhalten zwischen Primärtumor und Metastasen Befunde erzielen, über die oben angeschnittenen Fragen des Metastasierungsverhaltens Erklärung geben können?

## 2. MATERIAL UND METHODEN

Auswahlkriterien des Materials war die Diagnose Mammacarcinom mit Lymphknotenmetastasen, die anhand von Probeexcisionen oder postoperativ nach Ablatio mammae und axillärer Lymphknotenausräumung im Pathologischen Institut gestellt wurde.

40 Mammacarcinome und deren Lymphknotenmetastasen wurden von uns in chronologischer Reihenfolge der Jahre 1979 - 1981 in den Archiven des Pathologischen Instituts herausgesucht.

Es handelte sich dabei um 36 invasive duktile und 4 invasive lobuläre Carcinome, die uns in Hämalaun-Eosin (HE)-Färbung vorlagen.

Die pathologisch-histologische Klassifizierung erfolgte nach der histologischen Typisierung der WHO, den histologischen Graden (Bloom und Richardson 1957) und nach dem pTNM-Schema der UICC. Sonderformen von Mammacarcinomen sind in dem Untersuchungsgut nicht enthalten. Das Alter der Patientinnen lag zwischen 28 und 76 Jahren.

## 2.1. Histologisches Untersuchungsgut und Klassifizierung

Tab. Übersicht

| Fall  | Alter | Histologische<br>Strukturen<br>(WHO) | Histologischer<br>Grad<br>(Bloom) | Tumor-<br>stadium<br>(pTNM) |
|-------|-------|--------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| 1/1   | 69    | dukt., sol., großz., ger.drüs.       | I                                 | pT1/N1/Mx                   |
| 1/II  |       |                                      |                                   |                             |
| 2/I   | 41    | dukt., sol., mittelgr.z., vorw.dr.   | I                                 | pT2/N1/Mx                   |
| 2/II  |       |                                      |                                   |                             |
| 3/I   | 71    | dukt., sol., mittelgr.z., nicht dr.  | III                               | pT4/N1/Mx                   |
| 3/II  |       |                                      |                                   |                             |
| 4/I   | 59    | dukt., sol., großz., nicht dr.       | III                               | pT2/N1/Mx                   |
| 4/II  |       |                                      |                                   |                             |
| 5/I   | 48    | dukt., scir., mittelgr.z., nicht dr. | III                               | pT4/N1/Mx                   |
| 5/II  |       |                                      |                                   |                             |
| 6/I   | 49    | dukt., scir., mittelgr.z., vorw.dr.  | II                                | pT2/N1/Mx                   |
| 6/II  |       |                                      |                                   |                             |
| 7/I   | 62    | lob., scir., kleinz., nicht dr.      | III                               | pT2/N1/Mx                   |
| 7/II  |       |                                      |                                   |                             |
| 8/I   | 35    | dukt., sol., großz., nicht dr.       | II                                | pT4/N3/Mx                   |
| 8/II  |       |                                      |                                   |                             |
| 9/I   | 58    | dukt., sol., großz., nicht dr.       | II                                | pT2/N1/Mx                   |
| 9/II  |       |                                      |                                   |                             |
| 10/I  | 66    | dukt., sol., mittelgr.z., ger.dr.    | II                                | pT2/N1/Mx                   |
| 10/II |       |                                      |                                   |                             |
| 11/I  | 51    | lob., scir., mittelgr.z., nicht dr.  | III                               | pT2/N1/Mx                   |
| 11/II |       |                                      |                                   |                             |
| 12/I  | 45    | dukt., sol., großz., nicht dr.       | III                               | pT2/N1/Mx                   |
| 12/II |       |                                      |                                   |                             |
| 13/I  | 41    | dukt., scir., mittelgr.z., dr.       | II                                | pT1/N1/Mx                   |
| 13/II |       |                                      |                                   |                             |
| 14/I  | 57    | dukt., sol., großz., nicht dr.       | III                               | pT4/N2/Mx                   |
| 14/II |       |                                      |                                   |                             |
| 15/I  | 45    | dukt., scir., mittelgr.z., dr.       | II                                | pT1/N1/Mx                   |
| 15/II |       |                                      |                                   |                             |
| 16/I  | 57    | dukt., sol., großz., nicht dr.       | III                               | pT2/n3/Mx                   |
| 16/II |       |                                      |                                   |                             |
| 17/I  | 28    | dukt., sol., mittelgr.z., ger.dr.    | II                                | pT1/N1/Mx                   |
| 17/II |       |                                      |                                   |                             |
| 18/I  | 72    | dukt., sol., mittelgr.z., ger.dr.    | II                                | pT1/N2/Mx                   |
| 18/II |       |                                      |                                   |                             |
| 19/I  | 65    | dukt., scir., mittelgr.z., nicht dr. | II                                | pT2/N1/Mx                   |
| 19/II |       |                                      |                                   |                             |
| 20/I  | 59    | dukt., sol., großz., nicht dr.       | III                               | pT1/N1/Mx                   |
| 20/II |       |                                      |                                   |                             |
| 21/I  | 61    | dukt., scir., mittelgr.z., ger.dr.   | II                                | pT2/N2/Mx                   |
| 21/II |       |                                      |                                   |                             |
| 22/I  | 76    | dukt., sol., mittelgr.z., ger.dr.    | III                               | pT1/N1/Mx                   |
| 22/II |       |                                      |                                   |                             |
| 23/I  | 76    | lob., scir., mittelgr.z., ger.dr.    | III                               | pT2/N1/Mx                   |
| 23/II |       |                                      |                                   |                             |

Fortsetzung Tab. Übersicht

| Fall  | Alter | Histologische<br>Strukturen<br>(WHO) | Histologischer<br>Grad<br>(Bloom) | Tumor-<br>stadium<br>(pTNM) |
|-------|-------|--------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| 24/I  | 45    | dukt., sol., mittelgr.z., nicht dr.  | II                                | pTx/N1/Mx                   |
| 24/II |       |                                      |                                   |                             |
| 25/I  | 42    | dukt., sol., mittelgr.z., ger.dr.    | II                                | pT1/N1/Mx                   |
| 25/II |       |                                      |                                   |                             |
| 26/I  | 73    | dukt., sol., großz., nicht dr.       | III                               | pT2/N1/Mx                   |
| 26/II |       |                                      |                                   |                             |
| 27/I  | 53    | dukt., scir., mittelgr.z., nicht dr. | II                                | pT3/N2/Mx                   |
| 27/II |       |                                      |                                   |                             |
| 28/I  | 46    | dukt., sol., mittelgr.z., nicht dr.  | II                                | pTx/N1/Mx                   |
| 28/II |       |                                      |                                   |                             |
| 29/I  | 36    | dukt., scir., kleinz., nicht dr.     | II                                | pT2/N1/Mx                   |
| 29/II |       |                                      |                                   |                             |
| 30/I  | 60    | dukt., sol., großz., nicht dr.       | II                                | pT2/N1/Mx                   |
| 30/II |       |                                      |                                   |                             |
| 31/I  | 70    | dukt., sol., mittelgr.z., ger.dr.    | II                                | pT2/N1/Mx                   |
| 31/II |       |                                      |                                   |                             |
| 32/I  | 42    | dukt., sol., mittelgr.z., ger.dr.    | II                                | pT2/N1/Mx                   |
| 32/II |       |                                      |                                   |                             |
| 33/I  | 51    | dukt., sol., mittelgr.z., ger.dr.    | II                                | pT1/N1/Mx                   |
| 33/II |       |                                      |                                   |                             |
| 34/I  | 50    | dukt., sol., mittelgr.z., nicht dr.  | III                               | pT3/N1/Mx                   |
| 34/II |       |                                      |                                   |                             |
| 35/I  | 43    | dukt., sol., kleinz., nicht dr.      | II                                | pT2/N1/Mx                   |
| 35/II |       |                                      |                                   |                             |
| 36/I  | 57    | dukt., scir., kleinz., nicht dr.     | III                               | pT3/N2/Mx                   |
| 36/II |       |                                      |                                   |                             |
| 37/I  | 52    | dukt., scir., mittelgr.z., nicht dr. | III                               | pT1/N1/Mx                   |
| 37/II |       |                                      |                                   |                             |
| 38/I  | 69    | dukt., sol., kleinz., ger. dr.       | III                               | pT4/N2/Mx                   |
| 38/II |       |                                      |                                   |                             |
| 39/I  | 35    | dukt., sol., großz., ger. dr.        | III                               | pT2/N1/Mx                   |
| 39/II |       |                                      |                                   |                             |
| 40/I  | 33    | dukt., sol., kleinz., nicht dr.      | II                                | pT3/N1/Mx                   |
| 40/II |       |                                      |                                   |                             |

dukt. = inv. duktal  
lob. = inv. lobulär  
sol. = solid  
scir. = scirrhös  
gr.z. = großzellig  
dr. = drüsig  
ger. = gering

## 2.2 Vorbemerkungen zur Methode

Mit der von Coons in den fünfziger Jahren entdeckten Immunfluoreszenz wurde es möglich, Antikörper mit Markern zu koppeln und damit die Lokalisation von Antigenen in Geweben und Zellen sichtbar zu machen.

Als Marker benutzte Coons (1955) Fluorescein, wobei Fluorescein nur im lichtmikroskopischen Bereich und mit dem Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar war.

Statt der Anwendung zur Darstellung von Antigen-Antikörper Reaktionen durch Fluorescein wurden in der Folgezeit für den lichtmikroskopischen Nachweis Enzyme an Antikörper gebunden, in erster Linie die Peroxidase, eingeführt von Nakane und Pierce (1966).

Diese Peroxidase-gekoppelte Antigen-Antikörper-Reaktion wurde mit  $H_2O_2$  Farbstoffoxidierung unter Verwendung von 3-3-Diaminobenzidin (DAB) (Graham und Karnovsky 1966) einem elektronendichten Substrat, für das Elektronenmikroskop sichtbar gemacht.

Seit Einführung der Peroxidase-gekoppelten Antikörper Methode gab es immer wieder technische Modifikationen, aus denen die drei meist verwendeten Techniken hervorgingen: die direkte Methode, bei der das Antikörper-Molekül mit Peroxidase gekoppelt, bzw. das Fab oder Fab' Fragment des Antikörpers direkt gegen das gesuchte Antigen gerichtet ist; die indirekte Methode (s.u.) und die Peroxidase-Antiperoxidase-Methode (PAP) (Sternberger 1979).

Wir entschieden uns für die indirekte Immunperoxidase-Methode (IPO), (Nakane und Pierce 1966, Burns 1975, Heydermann und Neville 1977, Mesa-Tejada 1977, Primus 1978, Taylor 1978, Sharkey 1980, Nathrath 1982, Bergroth 1982, Fritz 1985) weil sie einfacher ist als die PAP-Methode und zuverlässiger als die direkte Methode.

Die indirekte Immunperoxidase-Methode beginnt in der ersten Reaktion mit der Applikation eines Antikörpers, hier normales Ziegenserum, das die Aufgabe hat, mit unspezifischen Antigenen zu reagieren, bzw. sie abzudecken.

Bei der zweiten Reaktion hat das erste Immunserum, Kaninchen anti-TPA bzw. anti-CEA, nun die Aufgabe, die spezifischen Antigene aufzufinden. Es wird in starker Verdünnung nach genauer Austestung durch Vorversuche (TPA 1:400, CEA 1:200) angewendet, um Kreuzreaktionen oder nicht spezifische Antigene auszuschalten. Bei der Verdünnung von 1:200 zeigte sich bei CEA in normalen Colonepithelien noch eine luminale Membranreaktion.

Daß sowohl TPA als auch CEA sich mit immunhistochemischer Methode leicht nachweisen lassen, ist in zahlreichen Publikationen beschrieben (Denk 1973, 1976, Primus 1975, Goldenberg 1978, Wagener 1978, Shousha 1979, Nathrath 1982, Björklund 1982).

In der letzten Reaktion mit dem zweiten Immunserum, Peroxidase konjugiertem Ziege-anti-Kaninchen IgG, reagieren die IgG Antikörper gegen die Antigene, den Immunglobulinen der Spezies des ersten Immunserums. So reagieren das Immunglobulin des ersten Immunserums und das Immunglobulin des zweiten Immunserums untereinander. Dieses zweite Immunserum ist mit der Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Histologische Lokalisation der Antigen-Antikörperreaktion wird durch die anschließende Färbbehandlung möglich, deren Prinzip aus einer Redox-Reaktion zwischen Peroxidase, ihrem Substrat  $H_2O_2$  und dem Farbstoff AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazole) besteht. Oxydiertes AEC-Polymerisat haftet rot am Ort der Immunreaktion und kennzeichnet so das gesuchte Antigen.

#### 2.2.1. Methoden

Neben den üblichen histologischen Färbungen wie HE wurden die Tumoren histologisch nach ihrem Bautyp unterklassifiziert, die dabei getroffenen Unterformen wie drüsig, solid, scirrhös werden in Tab. Übersicht aufgeführt. Bei allen Primärtumoren wurde der histologische Grad nach Bloom (1957) bestimmt, in die Kernpolymorphie,

drüsiger Differenzierungsgrad und Mitoserate miteingingen.

Für alle Tumoren erfolgte eine Tumorstaging (Stadienbestimmung) nach dem pTNM-Stadium (UICC).

Die Bewertung erfolgte anhand der HE-Schnitte.

### 2.3. Immunhistochemische Methoden

Zur Untersuchung unseres Materials wendeten wir die indirekte Immunperoxidase Methode (Nathrath 1982) an.

Als Antiserum gegen CEA verwendeten wir ein kommerzielles Antiserum (Dakopatts), das von Herrn Prof. Lamerz zuvor gegen NCA "Non-spezifisch cross-reacting antigen" mit normalen Lungen- und Milzextrakten absorbiert und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde.

Das Antiserum gegen TPA wurde uns freundlicherweise von Dr. Björklund, Schweden, überlassen. Es wurde von Kaninchen, die gegen TPA:B1 Subfraktion immunisiert wurden, hergestellt. Das Antiserum wurde vor Gebrauch durch Affinitätschromatografie gereinigt (Björklund 1982).

#### 2.3.1. Durchführung der indirekten Immunperoxidase-Methode

Die formalinfixierten Gewebe wurden routinemäßig im Autotechnicon und in aufsteigender Alkoholreihe, Methylbenzoat und Benzen behandelt. Einbettung erfolgte in Paraffin.

Von jedem Block wurden 20 Schnitte von etwa jeweils 3 µm mit einem Mikrotom der Firma Leitz mit einem Stahlmesser von uns geschnitten. Die Schnitte, mit einem dünnen Papier vom Stahlmesser abgehoben, kamen zur Glättung der Oberfläche in ein ca. 40° C warmes Wasserbad, bevor sie auf den Objektträger gebracht wurden. Die Objektträger wurden zuvor mit Serum-Glycerin eingerieben, um das Ab-

schwimmen des Schnitts zu verhindern. Zum Antrocknen wurden die Schnitte für ca. 4 Tage in einen etwa 60° C warmen Brutschrank gestellt.

Nach Abkühlung kamen die Schnitte zunächst 15 min. in Xylol zum Entparaffinieren, dann wurden sie zum Rehydrieren in absteigender Alkoholreihe mehrmals gespült. Die formalinfixierten Schnitte wurden für TPA mit 0,1 % Pronase TYP VII (Sigma, München) inkubiert für ca. 15 min. bei Raumtemperatur. Wir legten dazu Diakästen mit feuchten Papierstreifen aus, die wir als Feuchtkammern benutzten. Durch Fixierung mit Formalin abgedeckte Antigene konnten durch Pronase-Behandlung bei TPA freigelegt und somit die spezifische Reaktion für TPA verbessert werden (Nathrath 1982). Für CEA zeigte sich keine Verbesserung der spezifischen Reaktionen durch Pronase-Vorbehandlung. Nach Ablaufen der Pronase wurden die Schnitte in Schaukeln gestellt und für 60 min. in kalt stehendem Phosphate Buffered Saline (PBS) bei 4° C belassen.

Folgende Schritte waren für TPA und CEA gleich.

Bei allen Schnitten wurde die endogene Peroxidaseaktivität durch Inkubation zunächst mit Wasserstoffperoxid 5 min. bei Raumtemperatur, anschließend in 2,28 % Perjodsäure, geblockt.

Ansatz:

50 ml Perhydrol 30 %  $H_2O_2$

(Art. 7209, Merck, Darmstadt)

150 ml aqua dest.

Ansatz:

22,8 g Perjodsäure krist.

(Art. 524 H 5 J06, Merck, Darmstadt) auf

1000 ml aqua dest. angesetzt.

Zuletzt folgte die Behandlung mit 0,02 % Natrium-Borhydrid (Heydermann und Neville 1977).

Ansatz:

40 mg Natriumborhydrid

(Pulver, Art. 806373,  $NaBH_4$ , Merck-Schuchart) ad

200 ml aqua dest., in einem Meßzylinder miteinander verührt.

Die Schnitte wurden wie nach jedem Schritt 2 x 5 min. in PBS-Puffer gespült, dann 5 min. mit 10 % normalem Ziegen-serum (Normal Goat Serum Reference, Nordic Immunology, Tilburg, Niederlande) inkubiert, um nicht spezifische Antigene abzudecken und um Hintergrundreaktionen zu vermeiden.

Ansatz:

1 ml Stammlösung Normal Goat Serum und 9 ml PBS-Puffer

Spülung mit PBS 2 x 5 min.

Ansatz PBS-Puffer

85 g NaCl (Art. 6404, Natriumchlorid krist., Merck, Darmstadt)  
12,7 g  $\text{Na H}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$   
(Art. 6580, Di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat, Merck, Darmstadt)

3,9 g  $\text{Na H}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

(Art. 6346, Natriumhydrogenphosphat-1-hydrat, Merck, Darmstadt)

Die Substanzen wurden nacheinander in ca. 3 ltr. aqua dest. gegeben und auf einer Heizplatte mit Magnetrührer jeweils einzeln zur Lösung gebracht. Die gelösten Substanzen wurden mit aqua dest. auf 10 ltr. aufgeschüttet und mit Natronlauge auf einen pH von 7,2 - 7,3 eingestellt. Die Kontrollschnitte, jeweils für Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen, die nicht mit Antiseren beträpfelt wurden, machten den nächsten Schritt nicht mit.

Das erste Immunserum, Kaninchen anti-TPA bzw. anti-CEA nach Absorpton mit Lungen- und Milzextrakten, wurde auf die Schnitte appliziert und für 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde in starker Verdünnung (für CEA 1:200, für TPA 1:400) angewendet.

Spülung 2 x 5 min. in Brij-Lösung.

Ansatz:

5 ml 1 % Brij ad 1000 ml PBS-Puffer. 1 % Brij wird aus 30 % Brij angesetzt. Mit 1 ml 30 % Brij und plus 29 ml

PBS-Puffer erhielten wir eine gebrauchsfertige Brij-Lösung. Das zweite Immunserum, Peroxidase konjugiertes Ziege anti-Kaninchen IgG Serum (PO Nr. 19, Art. GAR/IgG (H+L)/PO, Immunoconjugate Nordic, Niederlande) in einer Verdünnung von 1:800 für 15 min. wurde auf die Schnitte appliziert.

Ansatz:

1 ml PO Nr. 19 plus 8 ml PBS-Puffer

Spülung 2 x 5 min. Brij-Lösung.

Die histologische Lokalisation der Antigen-Antikörperreaktion wurde dann durch die anschließende Färbehandlung ermöglicht.

Ansatz:

- a) 20 mg AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazole, Sigma, Chemical Company, St. Louis, USA) die in 12 ml DMS-Dimethylsulfoxide (Merck, Darmstadt) unter Abzug gelöst wurde (Graham 1965, Schaefer und Fischer 1968)
- b) 100 ml 0,1 M Michaelispuffer, den wir mit 1 N HCl auf einen genauen von pH 7,4 eingestellt hatten (Vernonal-Na Puffer nach Michaelis 0,1 M, pH 0,8 Apotheke der Klinischen Universitätsanstalten). Diese Substanzen wurden durch ein Filterpapier gefiltert.
- c) der gelöste Farbstoff (20 mg AEC plus 12 ml DMSO) zugegeben
- d) mit dem Gefäß, in dem die Farbe gelöst war, auf 200 ml mit aqua dest. aufgefüllt
- e) 10 µl 30 %  $H_2O_2$  zugegeben.

Die Schnitte wurden 30 min. in der Farbe belassen und in Mayers Hämalaun für 2 min. zur Darstellung der Kerne gegengefärbt, unter fließendem Leitungswasser gespült und in Kaiser's Glyceringelatine (Art. 9242, Merck, Darmstadt) eingedeckt.

## 2.4. Auswertungsmethodik

Um das Verhalten der beiden polyklonalen Antigene TPA und CEA in Primärtumoren und ihren axillären Lymphknotenmetastasen miteinander vergleichen zu können, wurde bei allen Vorbehalten möglicher fixationsbedingter Schwankungen (Goldenberg 1976, Nathrath 1984) eine semiquantitative Schätzung von zwei Untersuchern im Gewebe aus der Zahl der gefärbten Zellen und ihrer Färbeintensität versucht. Die relative Verlässlichkeit dieser Bewertungen ergab sich aus der Übereinstimmung beider Untersucher in etwa 80 % der Bewertungen.

Fälle mit fraglicher Reaktion wurden nochmals gefärbt und untersucht.

Auswertungskriterien waren:

1. Färbeintensität, wobei vier Reaktionen unterschieden wurden:

- |                            |                                                |
|----------------------------|------------------------------------------------|
| - negativ (-)              | = keine gefärbte Zelle im Gewebe               |
| - schwach positiv (+)      | = schwach positiv gefärbte Zellen<br>im Gewebe |
| - mittelstark positiv (++) | = stärker positiv gefärbte Zellen<br>im Gewebe |
| - stark positiv (+++)      | = stark positiv gefärbte Zellen<br>im Gewebe   |

Diese quantitativen Bewertungsdaten wurden in Beziehung gesetzt zu histologischer Struktur, Tumorstadium (Staging) und histologischem Grad (Grading), wobei die Bewertung analog zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastasen gemacht wurden.

Darüber hinaus wurde es notwendig, ein weiteres Merkmal für die Bewertung des Reaktionsausfalls einzuführen, da in der Mehrzahl der Fälle innerhalb eines Tumors Zellen unterschiedlich reagierten.

2. Gleichmäßigkeit (Homogenität) und Ungleichmäßigkeit (Heterogenität), diese Arbeitsbegriffe wurden in drei Kategorien unterteilt:

- gleichmäßig positiv:

(im weiteren bezeichnet als homogen), wenn mehr als 50 % der gefärbten Zellen nur eine Färbeintensität hatten

- ungleichmäßig positiv:

(im weiteren bezeichnet als heterogen), wenn mehr als 50 % der Zellen gefärbt, aber mehrere unterschiedliche Färbeintensitäten dabei aufwiesen

- teilweise negativ:

wenn weniger als 50 % (meist weniger als 30 %, dies kommt nur für CEA in Betracht) der Tumorzellen eine positive immunhistochemische Reaktion aufwiesen.

- negativ:

wenn Zellen keine Reaktion zeigten.

3. Zelluläres Reaktionsmuster durch unterschiedliche Färbemuster im positiven Bereich bezogen auf die Form des Reaktionsausfalls und die einzelne Tumorzelle ergaben sich

- eine gleichmäßige oder diffuse intrazelluläre Reaktion, sie wurde als "intracytoplasmatisch" bezeichnet (Abb.1),
- polarisiert intrazellulär am oberen oder unteren Zellpol (Abb.2),
- eine ausschließlich an der Zelloberfläche kondensierte Färbung, der "membranöse" Typ, mit z.T. netzförmigem Aspekt (Abb.3 und Abb.4).

Auch hier wurde geprüft, ob Primärtumoren sich zu ihren Metastasen anders verhielten.

Die Reaktionsweise des "intracytoplasmatischen" und "membranösen" Typs wurde bei den Mammacarcinomen mit soliden und drüsigen Strukturen beobachtet. Weder die Reaktion an den Zellpolen noch der Reaktionsausfall perinukleär waren bei den untersuchten Mammacarcinomen so häufig in den Tumorzellen entwickelt, daß sie das führende Reaktionsmuster darstellten.

Zwar fand sich dieser Reaktionsausfall in den meisten Tumoren, aber regelhaft nur in sehr umschriebenen kleinen Tumorzellabschnitten. Sobald drüsig-tubuläre Strukturen auftauchten, wurde häufig ohne stärkere intracytoplasmatische Reaktion eine Polarisation, wenn auch nicht regelhaft, an dem oberen oder unteren Zellpol, so doch häufig, beobachtet.

Bei drüsigen Strukturen mit Reaktion am oberen oder unteren Zellpol muß aber festgestellt werden, daß die übrigen zellulären Darstellungen keine erkennbaren systematischen Beziehungen zu den histologischen Strukturtypen aufwiesen.

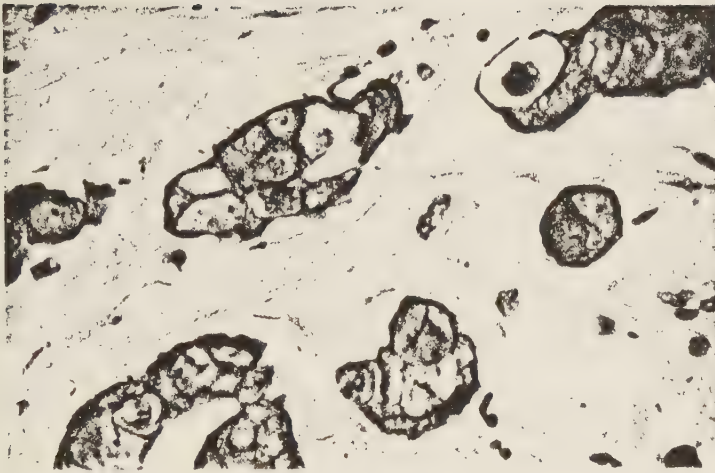


Abb.1: TPA Primärtumor, links oben im Bild glandulär andeuteete Strukturen, mit stärkerer Reaktion an den Zellpolen; Bildmitte "membranöser" Typ; rechts diffuse intracytoplasmatische Reaktion

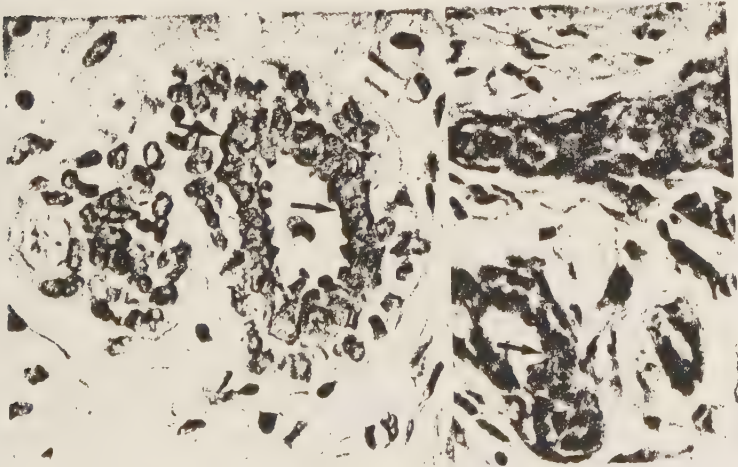


Abb.2: TPA li. Bild: normale Mamma mit duktulären Strukturen, Kondensation am oberen und unteren Zellpol (s. Pfeile) TPA re. Bild: oben Carcinom mit solidem Tumorzapfen, intracytoplasmatische Reaktion, unten duktales Anordnung, wobei TPA dem Lumen zugeordnet ist (s.Pfeil)



Abb. 3: TPA Primärtumor "membranöser" Typ mit Kondensation am Cytoplasmarand

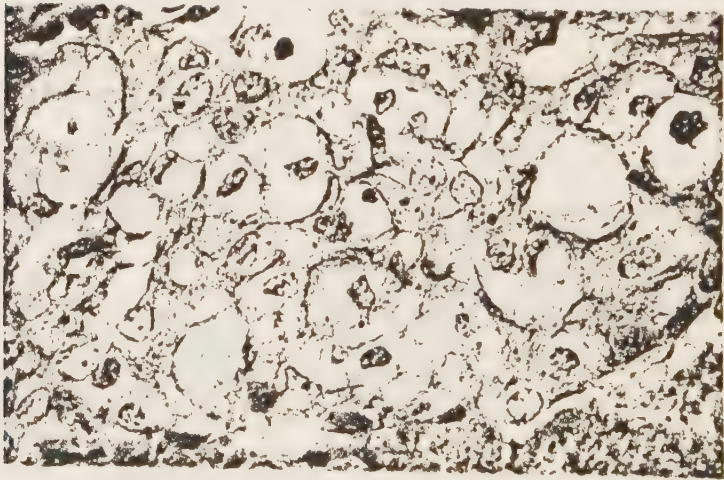


Abb. 4: TPA Lymphknotenmetastase des Primärtumors (Abb. 3), Wiederholung des "membranösen" Typs mit stark positiver Reaktion

### 3. ERGEBNISSE

#### 1. Auswertung

#### 3.1. Der immunhistochemische Nachweis von Tissue-Polypeptid Antigen (TPA) in Primärtumoren

##### 3.1.2. Allgemeiner Reaktionsausfall für TPA in Primärtumoren

Von den 40 untersuchten Primärtumoren der Mamma zeigten alle beim immunhistochemischen Nachweis von TPA, wenn auch in unterschiedlicher Intensität, eine positive Reaktion.

Die Quantität des Reaktionsausfalls, geschätzt an der Farbintensität, ergab jedoch deutliche Unterschiede. 15 der 40 Fälle (37,5 %) zeigten eine schwach positive Reaktion (+); dabei handelt es sich um 13 duktale und zwei lobuläre Carcinome.

Eine mittelstarke Reaktionsintensität zeigten 18 von 40 Fällen (45 %); davon waren 17 duktale und ein lobuläres Carcinom.

Eine starke Reaktionsintensität wurde in 7 von 40 Fällen beobachtet (17,5 %), davon waren sechs duktale und ein lobuläres Carcinom.

Bereits bei dieser allgemeinen Übersicht über die Reaktionsintensität und die Gleichförmigkeit von TPA in Primärtumoren sind zwei generelle Beobachtungen besonders zu betonen:

1. Die in den Primärtumoren unterschiedlich ausgeprägten Nekroseareale waren grundsätzlich negativ in der TPA-Reaktion (s. Abb.5).
2. Die Tumorzellen im Bereich der Invasionsfront zeigten ungewöhnlich häufig bei dukталen wie lobulären Carcinomen mit "indian file"-Formation, wenn auch innerhalb eines Tumors nicht regelhaft, eine besonders starke Reaktionsintensität beim Nachweis von TPA; dies kommt besonders bei einzelnen Tumorzellen

(s. Abb.6 und Abb.7), die das umgebende Mammafett- und Bindegewebe infiltrieren, zur Geltung. Dieser Befund hat bei der praktischen Diagnostik Bedeutung erlangt, wenn etwa bei der bioptischen Diagnostik zwischen einem entzündlichen Zellinfiltrat oder einer Tumorzelldurchsetzung entschieden werden soll.

Die aus dieser allgemeinen Übersicht ersichtliche Variation der Reaktionsintensität beim Nachweis von TPA im Primärtumor gab Anlaß im Folgenden zu prüfen, ob möglicherweise diese mit Unterschieden im histologischen Grad der Tumoren, Unterschieden im Tumorstadium oder mit besonderen histologischen Strukturmustern in Verbindung stehen; die Ergebnisse dieser Überprüfung werden in den nächstfolgenden Abschnitten dargestellt.

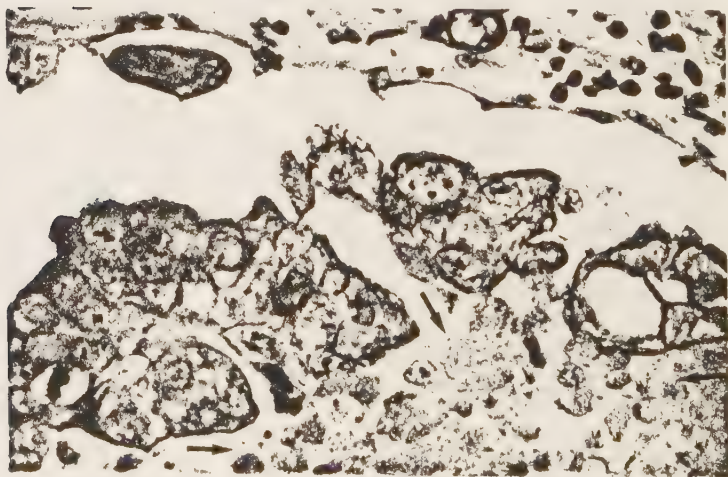


Abb.5: TPA Primärtumor mit starker intracytoplasmatischer - homogener positiver Reaktion. TPA-negative Zellstrukturen (s. Pfeile) bei Verlust der Cytoskelettstruktur

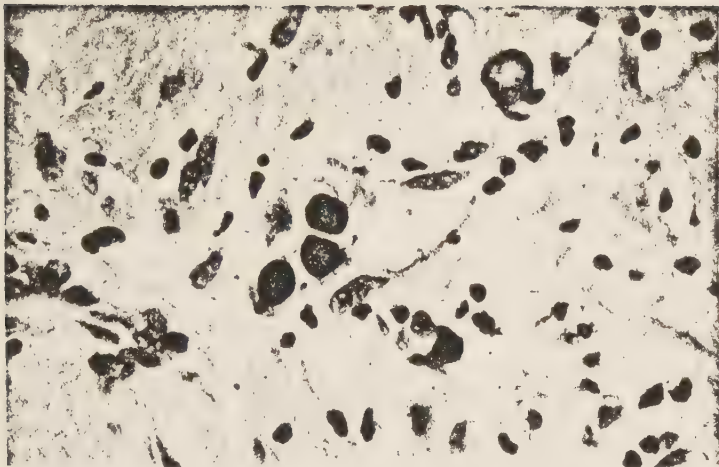


Abb.6: TPA invasives duktales Carcinom an der Invasionsfront mit starker intracytoplasmatischer Reaktion der einzeln infiltrierenden Zellen



Abb.7: TPA invasives lobuläres Carcinom mit "indian file"-Formation und stark positiver intracytoplasmatischer Reaktion der infiltrierenden Zellen

### 3.1.3. Färbeintensität für TPA in Primärtumoren in Beziehung zum histologischen Grad

Für die histologischen Gradbestimmungen der duktaalen Carcinome wurde das Vorgehen von Bloom (siehe Methodik) angewandt.

Für die invasiven lobulären Carcinome erfolgte das Grading durch Bestimmung von Kernpolymorphie und Mitoserate.

Von den 36 duktaalen Mammacarcinomen wiesen zwei den histologischen Grad I, 17 den histologischen Grad II und 17 den histologischen Grad III auf. Von den 4 lobulären Carcinomen zeigte ein Carcinom Grad II, drei den histologischen Grad III.

Dabei zeigte sich, daß die beiden Mammacarcinome mit dem histologischen Grad I nur eine schwache bzw. mittelstarke Reaktion aufwiesen, dagegen keine starke Reaktion, während die Fälle mit histologischem Grad II und III deutlich häufiger mittelstarke und starke Reaktionsintensitäten für TPA zeigten.

Die vier lobulären Carcinome (soweit beurteilbar) zeigten ein Carcinom in Grad II mit mittelstarker Reaktion, drei Carcinome in Grad III; davon waren zwei Carcinome schwach positiv und ein Carcinom stark positiv.

Die Ergebnisse des Vergleichs der Färbeintensitäten mit histologischem Grad ist in Tab. 1 niedergelegt.

Tab. I: Färbeintensität für TPA in duktaalen und lobulären Primärtumoren in Beziehung zum Grading

|     | G I | G II     | G III     |
|-----|-----|----------|-----------|
| +   | 1   | 7        | 5<br>2L   |
| ++  | 1   | 8<br>1 L | 9         |
| +++ |     | 2        | 3<br>1 L. |

(L = lobulär)

### 3.1.4. Die Färbeintensität für TPA in Primärtumoren in Beziehung zum Tumorstadium

Für die Größenbestimmung der duktaalen sowie der lobulären Carcinome wurden die pTNM-Stadien nach der UICC (siehe Methodik) angewandt.

Von den 36 duktaalen Mammacarcinomen wiesen zwei das Stadium pTx (die Tumorgröße konnte nicht exakt bestimmt werden, da die Tumoren in verschiedenen Stücken vorlagen) auf. Neun zeigten das Stadium pT1, 16 das Stadium pT2, vier das Stadium pT3, und fünf das Stadium pT4.

Von den vier lobulären Carcinomen zeigte ein Carcinom pT1, drei Carcinome pT2.

Es zeigte sich, daß Carcinome im Stadium pTx nur eine schwache Reaktion zeigten, Carcinome der Stadien pT1 und pT2 gleichsinnig verteilt eine schwache, mittelstarke und starke Reaktion zeigten, Carcinome mit pT3 keine schwache, einmal eine mittelstarke, alle übrigen eine starke Reaktion aufwiesen, beim Stadium pT4 gleichmäßig schwache und mittelstarke Reaktionen zeigten.

Die lobulären Carcinome zeigten alle Färbeintensitäten ohne Bezug zum jeweiligen Tumorstadium.

Die Ergebnisse des Vergleichs der Färbeintensitäten mit Größe des Tumors sind in Tabelle II angegeben (L= lobulär).

Tab. II: Färbeintensität für TPA in duktaalen und lobulären Primärtumoren in Beziehung zum Staging

|     | pTx | pT1       | pT2       | pT3 | pT4 |
|-----|-----|-----------|-----------|-----|-----|
| +   | 2   | 3         | 6<br>2L   |     | 2   |
| ++  |     | 5<br>1 L. | 8         | 1   | 3   |
| +++ |     | 1         | 2<br>1 L. | 3   |     |

### 3.1.5. Färbeintensität für TPA in Primärtumoren in Beziehung zur histologischen Struktur

Die histologische Struktur wurde eingeteilt nach solidem und scirrhösem Wachstum, nach drüsigen und nicht drüsigen Strukturen (s. histologisches Untersuchungsgut Tab. Übersicht).

Von 36 dukталen Mammacarcinomen zeigten 28 solide Verbände, die überwiegend schwache und mittelstarke, und auch starke Reaktion zeigten. Acht von den dukталen Carcinomen zeigten scirrhöse Verbände mit schwachen, häufig mittelstarken und starken Reaktionen.

Von 36 dukталen Mammacarcinomen zeigten 17 Carcinome drüsige Strukturen, die in der Mehrzahl der Fälle schwache und mittelstarke Reaktion, selten eine starke Reaktion zeigten. 19 von den dukталen Carcinomen zeigten nicht drüsige Strukturen, die Mehrzahl der Fälle zeigten schwache und mittelstarke Reaktion, ein Viertel der Fälle eine starke Reaktion.

Von vier lobulären Carcinomen zeigte kein Carcinom solide Verbände, scirrhöse Strukturen verteilten sich über alle Färbeintensitäten, drüsige Strukturen zeigten schwache und mittelstarke, nicht drüsige Strukturen schwache und starke Reaktion.

Die Ergebnisse des Vergleichs der Färbeintensitäten mit der histologischen Struktur werden in Tabelle III a bzw. Tabelle III b gezeigt.

Tab.III a: Färbeintensität für TPA in Primärtumoren in  
Beziehung zur histologischen Struktur bei  
duktalen und lobulären Carcinomen

duktale Carcinome

|     | <u>solid</u> | <u>scirrhös</u> | <u>drüsig</u> | <u>nicht drüsig</u> |
|-----|--------------|-----------------|---------------|---------------------|
| +   | 12           | 2               | 8             | 6                   |
| ++  | 12           | 4               | 7             | 9                   |
| +++ | 4            | 2               | 2             | 4                   |

Tab.III b:

lobuläre Carcinome

|     | <u>solid</u> | <u>scirrhös</u> | <u>drüsig</u> | <u>nicht drüsig</u> |
|-----|--------------|-----------------|---------------|---------------------|
| +   |              | 2               | 1             | 1                   |
| ++  |              | 1               | 1             |                     |
| +++ |              | 1               |               | 1                   |

3.2. Der immunhistochemische Nachweis von TPA  
in Metastasen

3.2.1. Allgemeiner Reaktionsausfall für TPA in Metastasen

In den 40 Lymphknotenmetastasen der zuvor untersuchten Primärtumoren konnte in allen Fällen TPA immunhistochemisch nachgewiesen werden, in unterschiedlicher Intensität und in allen Fällen positiv.

Bei den unterschiedlichen Intensitäten im Reaktionsausfall zeigten sechs der 40 Fälle (15 %) bei den Lymphknotenmetastasen der duktalen Primärtumoren eine schwach positive Reaktion.

22 von 40 (55 %) Fällen zeigten in den Lymphknotenmetastasen eine mittelstarke Reaktion, davon waren 20 Lymphknotenmetastasen duktaler Primärtumoren und zwei Lymph-

knotenmetastasen lobulärer Primärtumoren.

12 von 40 (30 %) Fällen zeigten in den Lymphknotenmetastasen eine starke Reaktion, davon waren 10 Fälle Lymphknotenmetastasen duktaler Carcinome und zwei Fälle Lymphknotenmetastasen lobulärer Carcinome.

### 3.2.1.2. Vergleich der Intensität des Reaktionsausfalls für TPA in Primärtumoren und Metastasen

Im Vergleich der Färbeintensitäten zwischen dukталen und lobulären Carcinomen und ihren Metastasen fanden sich bei den Primärtumoren in der schwach positiven Gruppe 15 Fälle, davon 13 duktale und zwei lobuläre Primärtumoren; in den Metastasen der lobulären Primärtumoren fand sich mit schwach positiver Reaktion kein Fall mehr, in den Metastasen der dukталen Primärtumoren gab es sechs Fälle, die schwach positiv geblieben sind. Diese anderen sieben Fälle verteilen sich nun in den Metastasen in höhere Färbeintensitäten, häufiger (vier) in starke und weniger häufig (drei) in mittelstarke Reaktionsausfälle.

Der Vergleich der Reaktionsstärke mit TPA zwischen den Primärtumoren und ihren Metastasen zeigte, das in den Metastasen duktaler Carcinome der mittelstarke Reaktionsausfall in drei Fällen häufiger auftrat, als bei den Primärtumoren.

In der Gruppe der stark positiven Reaktionsausfälle fand sich eine Zunahme von vier Fällen in den Metastasen der dukталen Primärtumoren, bei den Metastasen der lobulären Primärtumoren zeigte sich die Zunahme um einen Fall.

### 3.3. Färbeintensität für TPA in Metastasen in Beziehung zum histologischen Grad

Das histologische Grading der Primärtumoren nach Bloom wurde für die Metastasen von den jeweiligen Primärtumoren übernommen. Bei den Metastasen der invasiven lobulären Carcinome erfolgte das Grading wie bei den Primärtumoren nach Kernpolymorphie und Mitoserate.

Von den 36 duktalem Mammacarcinomen wiesen die Lymphknotenmetastasen in den zwei Fällen mit Grad I eine mittelstarke und eine starke Reaktion, die 17 Fälle mit Grad II eine fast gleiche Verteilung der schwachen und starken, häufiger der mittelstarken, und die 17 Grad III Fälle sehr selten eine schwache Reaktion, deutlich häufiger eine mittelstarke und starke Reaktion auf.

Von den vier lobulären Carcinomen wiesen die Lymphknotenmetastasen in zwei Fällen eine starke Reaktion in Grad III auf, und eine jeweils mittelstarke Reaktion in Grad II und Grad III.

Die Ergebnisse sind in Tabelle IV aufgezeigt.

Tab. IV: Färbeintensität für TPA in den Metastasen duktalem und lobulärer Carcinome in Beziehung zum Grading

|     | <u>G I</u> | <u>G II</u> | <u>G III</u> |
|-----|------------|-------------|--------------|
| +   |            | 5           | 1            |
| ++  | 1          | 8<br>1 L    | 11<br>1 L    |
| +++ | 1          | 4           | 5<br>2 L     |

(L= lobulär)

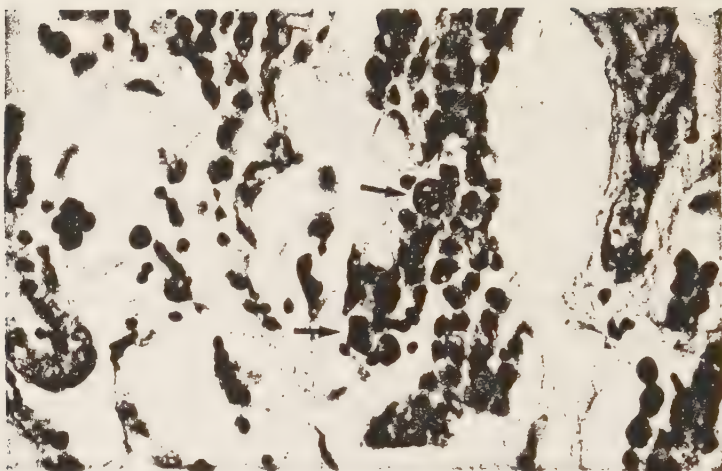


Abb.8: TPA Primärtumor mit solidem Tumorzapfen sowie Einzelzellen an der Invasionsfront intracytoplasmatisch stark positiv (s. Pfeile)

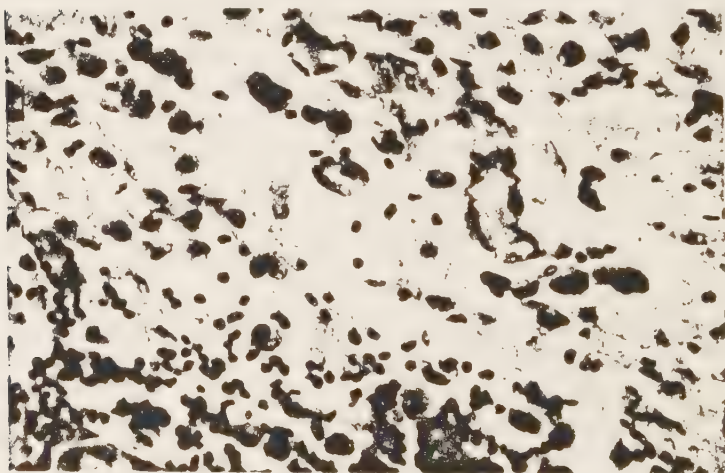


Abb.9: TPA Metastase mit Einzelzellen und gleichem Reaktionsmuster wie im Primärtumor (Abb.8)

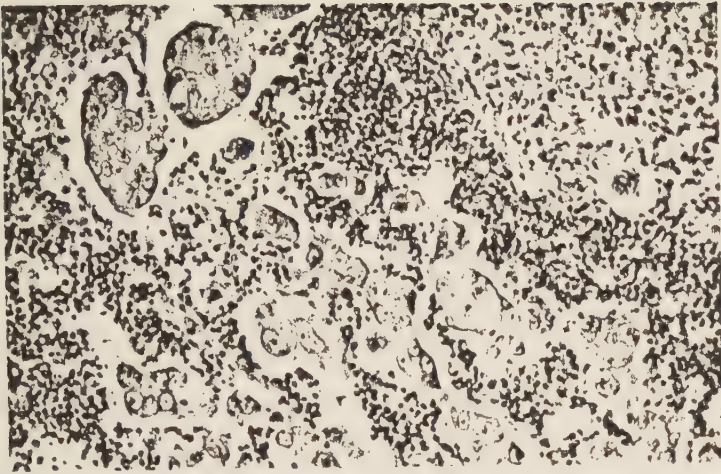


Abb.10: TPA Beispiel einer mittelstarken intracytoplasmatischen Reaktion in einer Lymphknotenmetastase

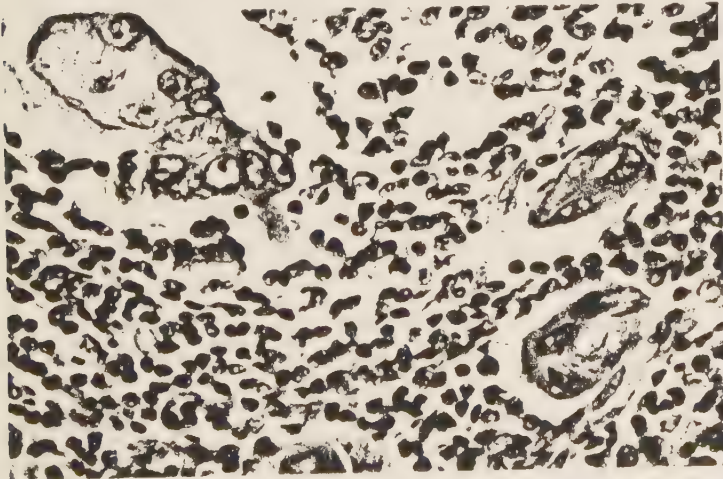


Abb.11: TPA bei stärkerer Vergrößerung der Lymphknotenmetastase (Abb.10) angedeutet "membranöser" Typ mit diffuser intracytoplasmatischer Reaktion

### 3.3.1. Vergleich der Intensität des Reaktionsausfalls für TPA in Primärtumoren und Metastasen in Be- ziehung zum histologischen Grad

Im Vergleich der Färbeintensitäten zwischen duktalem bzw. lobulärem Carcinomen und ihren Metastasen fand sich in den Fällen mit Grad I nach Bloom bei den duktalem Primärtumoren ein Fall, in der Metastase kein Fall mehr mit schwach positiver Reaktion. Ein Fall mit mittelstarker Reaktion blieb unverändert in der Metastase. Ein Fall, der in der Metastase stark positiv wurde.

In der Gruppe der Fälle mit Grad II nach Bloom gibt es bei den duktalem Primärtumoren sieben Fälle, bei den Metastasen gibt es zwei Fälle weniger, die schwach positiv reagierten.

Acht Fälle der duktalem Primärtumoren, die mittelstark reagierten, blieben in der Metastase unverändert, gleiches galt für einen Fall mit lobulärem Primärtumor und unveränderter Reaktionsstärke in der Metastase.

Bei den stark positiven Reaktionsausfällen fanden sich um die Hälfte mehr Metastasen mit dieser Reaktionsstärke als Primärtumoren.

In der Gruppe der Fälle mit Grad III nach Bloom gab es bei den duktalem Primärtumoren fünf Fälle mit schwach positiver Reaktion, in den Metastasen blieb ein Fall mit dieser Reaktionsstärke, jeweils zwei Fälle wurden in den Metastasen mittelstark, bzw. stark positiv.

Bei den zwei lobulären Primärtumoren in der Gruppe der schwach positiven zeigte keine Metastase eine schwach positive Reaktion, ein Primärtumor aus der Gruppe zeigte in der Metastase eine mittelstarke Reaktion, der andere Primärtumor eine starke Reaktion. Ein Primärtumor in der stark positiven Gruppe blieb stark positiv in der Metastase.

3.4. Färbeintensität für TPA in Metastasen in Beziehung zur Stadienbestimmung der Primärtumoren

Von den 36 dukталen Carcinomen zeigten zwei das Stadium pTx auf, die Metastasen dieser Carcinome im Stadium pTx zeigten eine schwach positive TPA-Reaktion.

Neun duktale Primärtumoren mit dem Stadium pT1 zeigten in den Metastasen sechs Fälle mit mittelstarker und drei Fälle mit starker Reaktion.

Ein lobuläres Carcinom mit dem Stadium pT1 in der Gruppe der mittelstarken Reaktion blieb in der Metastase unverändert.

16 duktale Primärtumoren mit dem Stadium pT2 zeigten in den Metastasen einen Fall mit schwach positiver Reaktion, 10 Fälle mit mittelstarker Reaktion und fünf Fälle mit starker Reaktion.

Bei den drei lobulären Primärtumoren blieben in der Metastase ein Fall mittelstark positiv und zwei Fälle zeigten starke Reaktion.

Vier duktale Primärtumoren mit dem Stadium pT3 zeigten in zwei Fällen in den Metastasen schwache Reaktion, jeweils ein Fall fand sich in den Metastasen mit mittelstarker, bzw. starker Reaktion.

Fünf duktale Primärtumoren mit dem Stadium pT4 zeigten in den Metastasen einen Fall mit schwach positiver Reaktion, drei mit Fälle mittelstarker positiver Reaktion und einen Fall mit starker Reaktion.

Die Ergebnisse der Färbeintensitäten mit der Stadiumbestimmung sind in Tabelle V angegeben.

Tab.V: Färbeintensität für TPA in Metastasen in Beziehung zur Stadienbestimmung der dukta-  
len und lobulären Primärtumoren (L= lobulär)

|     | pTx | pT1      | pT2       | pT3 | pT4 |
|-----|-----|----------|-----------|-----|-----|
| +   | 2   |          | 1         | 2   | 1   |
| ++  |     | 6<br>1 L | 10<br>1 L | 1   | 3   |
| +++ |     | 3        | 5<br>2 L  | 1   | 1   |

Da diese Vergleichsergebnisse wichtig erscheinen, sollen sie nochmals im Vergleich besprochen werden:

Im Vergleich der Färbeintensität gab es also in Beziehung zum Staging bei den dukta- len Primärtumoren und ihren Metastasen im Stadium pTx keine Änderung, sie blieben in ihrem Reaktionsausfall schwach positiv.

Die Fälle im Stadium pT1 zeigten drei schwach positive Reaktionsausfälle bei den dukta- len Primärtumoren, in den Metastasen zeigte sich kein Fall mehr mit schwach positiver Reaktion; diese Fälle verteilen sich in den Metastasen in mittelstarke und starke Reaktionen. Die Metastase eines lobulären Primärtumors reagierte unverändert mittelstark positiv. Im starken Reaktionsausfall fanden sich bei den Metastasen der dukta- len Primärtumoren zwei Fälle mehr. Die Fälle im Stadium pT2 zeigten bei den dukta- len Primärtumoren sechs Fälle und bei den lobulären Primärtumoren zwei Fälle, die schwach positiv reagierten. In den Metastasen der Primärtumoren im Stadium pT2 zeigte sich eine Abnahme von fünf Fällen bei den Metastasen der dukta- len Primärtumoren, es findet sich kein Fall einer Metastase eines lobulären Primärtumors mehr, die schwach positiv reagierte. In der Gruppe der mittelstark positiv reagierenden Fälle zeigte sich bei den dukta- len Primärtumoren eine Zunahme von zwei Fällen in den Metastasen, es fand sich auch eine Metastase eines lobulären Primärtumors.

Bei den stark positiven Reaktionsausfällen zeigte sich bei den Metastasen der duktaalen Primärtumoren eine Zunahme von drei Fällen, bei den Metastasen der lobulären Carcinome fand sich ein Fall mehr, der stark reagierte.

Die Fälle im Stadium pT3 fanden in den Metastasen eine geringere Reaktionsstärke als im Primärtumor, wobei dort kein Fall schwach positiv reagierte, in den Metastasen zeigten sich zwei Fälle mit schwach positiver Reaktion. Die Gruppe der mittelstark positiv reagierenden Fälle blieb in den Metastasen unverändert, die stark positiven nahmen in der Metastase in zwei Fällen ab.

Im Stadium pT4 gab es zwei duktaale Primärtumoren, die schwach positiv waren. In den Metastasen blieb ein Fall schwach positiv. Bei den mittelstark positiven Fällen gab es in den Primärtumoren drei Fälle, unverändert in den Metastasen. In dem stark positiven Reaktionsausfall gab es keine Primärtumoren, bei den Metastasen einen Fall.

### 3.5. Färbeintensität für TPA in Metastasen in Beziehung zur histologischen Struktur

Die histologische Struktur wurde wie beim Primärtumor nach solidem und scirrhösem Wachstum, nach drüsigen und nicht drüsigen Strukturen eingeteilt und in allen Fällen vom Primärtumor übernommen.

Von den 36 duktaalen Mammacarcinomen wiesen die Lymphknotenmetastasen in 28 Fällen solide Verbände auf, die überwiegend mittelstarke und starke, seltener schwache Reaktion zeigten. Von den acht duktaalen Carcinomen wiesen die Lymphknotenmetastasen in scirrhösen Verbänden mittelstarke und starke Reaktion auf.

Von den 36 dukталen Mammacarcinomen wiesen die Lymphknotenmetastasen in 17 Fällen drüsige Strukturen auf, die häufig mittelstarke Reaktion, weniger starke und selten schwache Reaktion zeigten. Die 19 Fälle mit nicht drüsigen Strukturen zeigten schwache Reaktion, in der Mehrzahl mittelstarke und starke Reaktion. Von vier lobulären Carcinomen zeigten die Lymphknotenmetastasen keine soliden Verbände, die scirrhösen Anteile wiesen mittelstarke und starke Reaktion auf. Die vier Metastasen mit drüsigen, bzw. nicht drüsigen Strukturen zeigten mittelstarke bzw. starke Reaktion.

Die Ergebnisse des Vergleichs der Färbeintensitäten mit der histologischen Struktur werden in Tabelle VI a und VI b gezeigt.

Tab.VIa: Färbeintensität für TPA in den Metastasen in Beziehung zur histologischen Struktur

Metastasen duktaler Carcinome

|     | <u>solid</u> | <u>scirrhös</u> | <u>drüsig</u> | <u>nicht drüsig</u> |
|-----|--------------|-----------------|---------------|---------------------|
| +   | 6            |                 | 2             | 4                   |
| ++  | 14           | 5               | 10            | 9                   |
| +++ | 8            | 3               | 5             | 6                   |

Tab.VIb:

Metastasen lobulärer Carcinome

|     | <u>solid</u> | <u>scirrhös</u> | <u>drüsig</u> | <u>nicht drüsig</u> |
|-----|--------------|-----------------|---------------|---------------------|
| +   |              |                 |               |                     |
| ++  |              | 2               | 2             |                     |
| +++ |              | 2               |               | 2                   |

### 3.5.1. Vergleich der Intensität des Reaktionsausfalls für TPA in Primärtumoren und Metastasen in Beziehung zur histologischen Struktur

Im Vergleich der Färbeintensitäten gab es in Beziehung zur histologischen Struktur bei den Metastasen und ihren dukталen, soliden Primärtumoren eine Abnahme um die Hälfte der Fälle bei den schwach positiven Fällen der Metastasen, eine Zunahme der stark positiven Fälle in den Metastasen um die Hälfte der Fälle. Die Metastasen der duktal, scirrhösen Primärtumoren zeigten keine schwache Reaktion mehr und verteilen sich gleichmäßig in mittelstarke und starke Reaktionsausfälle.

Bei den dukталen Primärtumoren mit drüsigen Strukturen und ihren Metastasen zeigte ein Drittel der Fälle weniger eine schwach positive Reaktion in den Metastasen, diese Fälle verteilten sich gleichmäßig auf mittelstarke und starke Reaktionsausfälle in den Metastasen. Bei den dukталen Primärtumoren mit nicht drüsigen Strukturen und ihren Metastasen gab es zwei Fälle und eine Zunahme der Färbeintensität von schwach positiv in Primärtumoren zu stark positiv in den Metastasen.

Bei den Metastasen der lobulären, scirrhösen Primärtumoren zeigte sich keine schwache Reaktion mehr, es fand sich eine gleichmäßige Verteilung in mittelstarke und stark positive Fälle in den Metastasen.

Bei den Metastasen der lobulären, drüsigen Primärtumoren zeigte sich keine schwache Reaktion mehr, insgesamt eine Verschiebung in mittelstarke Reaktionsausfälle. Bei den lobulären Primärtumoren mit nicht drüsigen Strukturen zeigte sich in den Metastasen keine schwache Reaktionen mehr, sondern insgesamt eine Verschiebung in starke Reaktionsausfälle.

### 3.6. Der immunhistochemische Nachweis von CEA in Primärtumoren

#### 3.6.1. Allgemeiner Reaktionsausfall für CEA in Primärtumoren

Von 40 untersuchten Primärtumoren der Mamma zeigten 22 Carcinome beim immunhistochemischen Nachweis von CEA keine Reaktion, es gab kein Carcinom, bei dem alle Zellen gefärbt waren.

22 der 40 Fälle (55 %) zeigten keine Reaktion (-); dabei handelte es sich um 19 duktales und 3 lobuläre Carcinome.

13 der 40 Fälle (32,5 %) zeigten eine schwache Reaktion (+); alle waren duktales Carcinome.

Drei der 40 Fälle (7,5 %) zeigten eine mittelstarke Reaktion (++); alle waren duktales Carcinome.

Zwei der 40 Fälle (5 %), jeweils ein duktales und ein lobuläres Carcinom, zeigten starke Reaktion (+++).

Die bereits in der Methodik angegebenen zellulären Reaktionsmuster galten ebenfalls für CEA; doch gab es hier bestimmte Beobachtungen:

1. In den meisten Fällen zeigten nekrotische Areale eine schwach positive Reaktion, obwohl umgebende Carcinomzellen negativ blieben (s. Abb.13).
2. Einzeln infiltrierende Zellen in duktales wie in lobulären Carcinomen zeigten keine Reaktion.

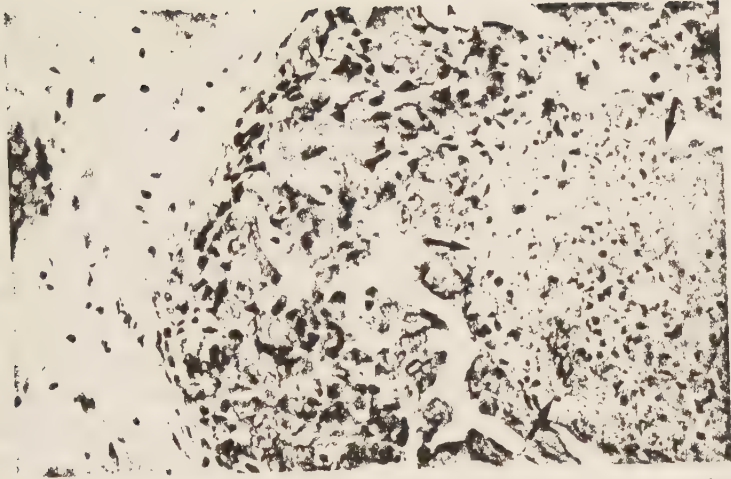


Abb.12: TPA mäßig differenziertes Adenocarcinom, histologisch Grad II, schwacher, aber deutlich positiver TPA-Nachweis der erhaltenen Tumoranteile. Negativ dagegen die Nekrosen im Bild rechts (s. Pfeile)

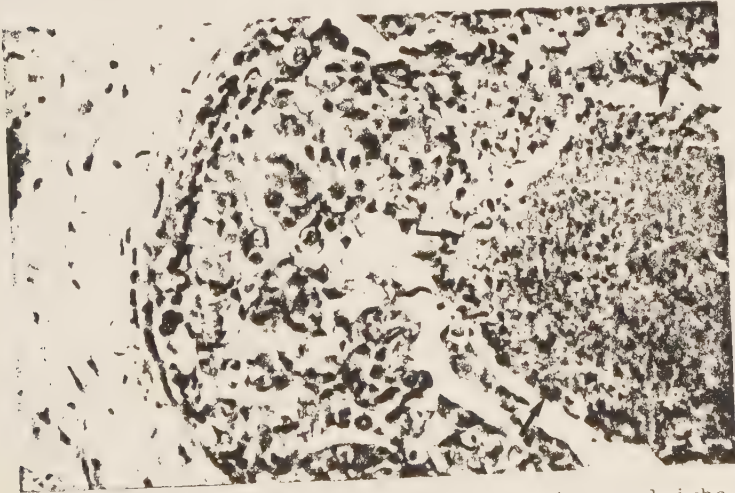


Abb.13: CEA mäßig differenziertes Adenocarcinom, gleiche Stelle wie in Abb. 12, bei CEA-Nachweis reagiert der erhaltene Tumoranteil negativ, die Nekrose im Bild rechts (s. Pfeile) dagegen positiv

### 3.6.2. Färbeintensität für CEA in Primärtumoren in Beziehung zum histologischen Grad

Die histologische Gradbestimmung der duktaalen Carcinome und der invasiven lobulären Carcinome wurde bereits in Abschnitt 3.1.2. besprochen.

Von den 36 duktaalen Mammacarcinomen wiesen die zwei Fälle mit dem histologischen Grad I eine negative und eine schwach positive Reaktion für CEA auf. Von den 17 Fällen Grad II zeigte die überwiegende Zahl negative und schwache Reaktion, selten mittelstarke und starke Reaktion. Von den 17 Grad III Fällen fand sich deutlich häufiger eine negative und schwach positive Reaktion, nur selten eine mittelstarke und starke Reaktion. Etwa gleiche Verteilung fand sich bei gleicher Anzahl von Fällen bei Grad III. Die lobulären Carcinome zeigten in drei von vier Fällen negative Reaktion, in einem Fall eine starke Reaktion. Die Ergebnisse sind in Tabelle VII angegeben.

Tab.VII: Färbeintensität für CEA in duktaalen und lobulären Primärtumoren in Beziehung zum Grading

|     | <u>G I</u> | <u>G II</u> | <u>G III</u> |
|-----|------------|-------------|--------------|
| -   | 1          | 9<br>1 L    | 9<br>2 L     |
| +   | 1          | 5           | 7            |
| ++  |            | 2           | 1            |
| +++ |            | 1           | 1 L          |

(L= lobulär)

### 3.6.3. Färbeintensität für CEA in Primärtumoren in Beziehung zum Tumorstadium

Für die Größenbestimmung der duktaalen und lobulären Carcinome wurden die pTNM-Stadien nach der UICC, wie bereits dargestellt, zu Grunde gelegt.

Von den 36 duktaalen Mammacarcinomen wiesen zwei das Stadium pTx auf, beide mit einer schwachen Reaktion. Bei den 9 Primärtumoren im Stadium pT1 war die Mehrzahl der Fälle negativ, schwache und mittelstarke Reaktionen kamen aber vor.

16 Fälle im Stadium pT2 waren Überwiegend negativ, nur wenige mit schwacher Reaktion und ein Fall mit stark positiver Reaktion. Vier Carcinome im Stadium pT3 verteilten sich gleichmäßig in negative, schwache und mittelstarke Reaktion. Eine gleichmäßige Verteilung in negative, schwache und mittelstarke Reaktion fand sich bei den fünf Fällen mit Stadium pT4.

Die vier lobulären Carcinome zeigten im Stadium pT1 negative, im Stadium pT2 negative und starke Reaktion.

Die Ergebnisse des Vergleichs der Färbeintensitäten mit Größe des Tumors finden sich in Tab. VIII.

Tab.VIII: Färbeintensität für CEA in duktaalen und lobulären Primärtumoren in Beziehung zum Staging (L= lobulär)

|     | pTx | pT1      | pT2       | pT3 | pT4 |
|-----|-----|----------|-----------|-----|-----|
| -   |     | 5<br>1 L | 11<br>2 L | 1   | 2   |
| +   | 2   | 3        | 4         | 2   | 2   |
| ++  |     | 1        |           | 1   | 1   |
| +++ |     |          | 1<br>1 L  |     |     |

#### 3.6.4. Färbeintensität für CEA in Primärtumoren in Beziehung zur histologischen Struktur

Die histologische Struktur der Mammacarcinome wurde eingeteilt nach solidem und scirrhösem Wachstum, nach drüsigen und nicht drüsigen Strukturen (s. histologisches Untersuchungsgut Tab.Übersicht).

Von 36 dukталen Mammacarcinomen zeigten, wie dargestellt, 28 solide Verbände, die überwiegend negative und schwache Reaktion zeigten, selten mittelstarke und starke Intensitäten. Acht Carcinome zeigten scirrhöse Verbände mit überwiegend negativen Reaktionen, selten schwache und mittelstarke Reaktion.

Von den 36 dukталen Mammacarcinomen zeigten 17 Carcinome drüsige Strukturen, die Mehrzahl war negativ, wenige schwach und selten mittelstark und stark positive Fälle. 19 Carcinome zeigten nicht drüsige Strukturen, fast alle Fälle waren negativ oder schwach positiv, ein Fall mit mittelstarker Reaktion.

Von den vier lobulären Carcinomen zeigten alle scirrhöse Verbände, die meist negativ und in einem Fall stark positiv waren.

Die lobulären Carcinome mit drüsigen Strukturen waren beide negativ, nicht drüsige Strukturen negativ und stark positiv.

Die Ergebnisse des Vergleichs der Färbeintensitäten mit der histologischen Struktur werden in Tabelle IX gezeigt.

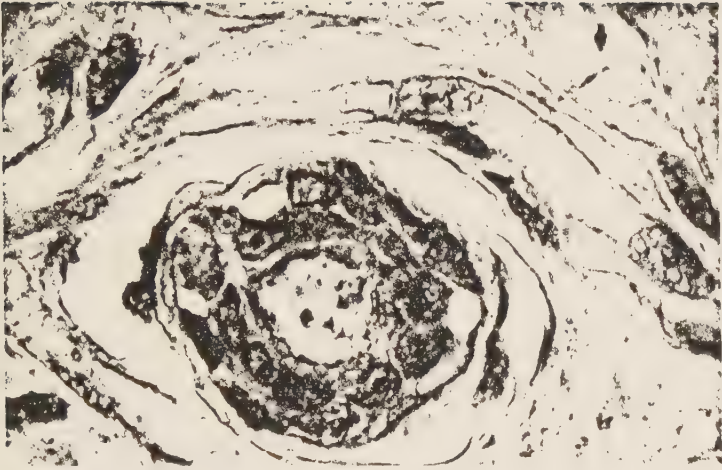


Abb.14: CEA normale glanduläre Strukturen der Mamma mit luminaler Reaktion, keine polare oder intracytoplasmatische Reaktion

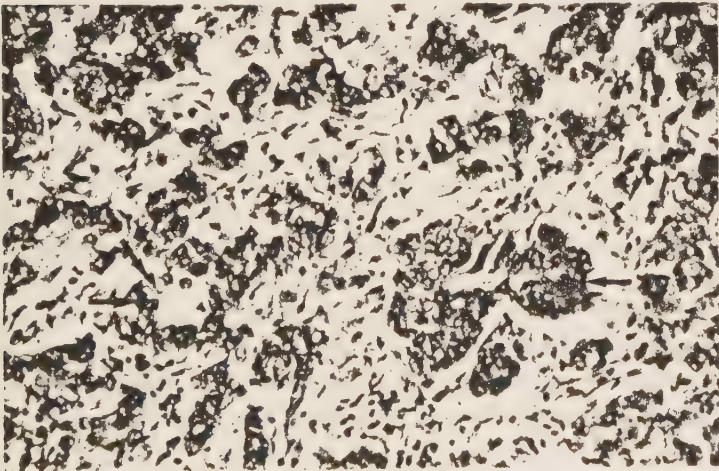


Abb.15: CEA Primärtumor, stark intracytoplasmatische Reaktion bei angedeuteten drüsigen Strukturen mit membranöser, intracytoplasmatischer und negativer Reaktion (s. Pfeile)

Tab.IX: Färbeintensität für CEA in duktafen und lobulären Primärtumoren in Beziehung zur histologischen Struktur (L= lobulär)

|     | <u>solid</u> | <u>scirrhös</u> | <u>drüsig</u> | <u>nicht drüsig</u> |
|-----|--------------|-----------------|---------------|---------------------|
| -   | 15           | 5<br>3 L        | 10<br>2 L     | 10<br>1 L           |
| +   | 10           | 2               | 4             | 8                   |
| ++  | 2            | 1               | 2             | 1                   |
| +++ | 1            | 1 L             | 1             | 1 L                 |

### 3.7. Der immunhistochemische Nachweis von CEA in Metastasen

#### 3.7.1. Allgemeiner Reaktionsausfall für CEA in Metastasen

In den 40 Lymphknotenmetastasen der zuvor untersuchten Primärtumoren konnte CEA in 11 Fällen nicht immunhistochemisch nachgewiesen werden. 11 der 40 Fälle (27,5 %) zeigten also in den Lymphknotenmetastasen keine Reaktion; davon waren neun Lymphknotenmetastasen duktafer Primärtumoren und zwei Lymphknotenmetastasen lobulärer Carcinome. 17 der 40 Fälle (42,5 %) zeigten in den Lymphknotenmetastasen eine schwache Reaktion, davon waren 16 Lymphknotenmetastasen duktafer Primärtumoren und eine Lymphknotenmetastase die eines lobulären Carcinoms. Sieben der 40 Fälle (17,5 %) zeigten in den Lymphknotenmetastasen eine mittelstarke Reaktion; davon waren alle Lymphknotenmetastasen von duktafen Primärtumoren.

Fünf der 40 Fälle (12,5 %) zeigten in den Lymphknotenmetastasen eine starke Reaktion; davon waren vier Lymphknotenmetastasen duktaler Carcinome, eine Lymphknotenmetastase die eines lobulären Carcinoms.

### 3.7.2. Vergleich der Intensität des Reaktionsausfalls für CEA in Primärtumoren und Metastasen

Von den 19 negativen dukталen Primärtumoren waren neun Lymphknotenmetastasen ebenfalls negativ, von den drei negativen lobulären Primärtumoren waren zwei Lymphknotenmetastasen negativ.

Eine schwach positive Reaktionsstärke zeigte sich bei 13 dukталen Primärtumoren, eine Zunahme fand sich in wenigen (drei) Fällen bei den Lymphknotenmetastasen der dukталen, eine Lymphknotenmetastase eines lobulären Primärtumors. Bei der mittelstarken Färbeintensität sind es drei duktale Primärtumoren, eine Zunahme fand sich mit sieben Lymphknotenmetastasen duktaler Primärtumoren.

Stark reagierten jeweils ein lobulärer und ein duktaler Primärtumor, in vier Fällen Lymphknotenmetastasen duktaler und eine Lymphknotenmetastase eines lobulären Primärtumors.

Generell läßt sich sagen, daß Metastasen stärker mit CEA reagierten als die jeweiligen Primärtumoren. Die negativen Fälle waren im Vergleich in den Metastasen um die Hälfte reduziert, mit fast gleichförmiger Aufteilung dieser Fälle in mittelstark und schwach positive Fälle.

### 3.7.3. Färbeintensität für CEA in den Metastasen in Beziehung zum histologischen Grad

Das histologische Grading der Primärtumoren nach Bloom wurde für die Metastasen von den jeweiligen Primärtumoren übernommen, bei den Metastasen der invasiven lobulären Carcinome wie dargelegt.

Von den 36 dukталen Mammacarcinomen wiesen die Lymphknotenmetastasen in den zwei Fällen Grad I eine negative und eine mittelstarke Reaktion auf, die 17 Fälle Grad II in der Mehrzahl eine schwache Reaktion, selten eine mittelstarke, und zu gleichen Anteilen negative und stark positive Reaktionen.

Die 17 Fälle mit Grad III zeigten keine starke Reaktion, sonst eine gleiche Verteilung wie in Grad II.

Die Ergebnisse sind in Tabelle X wiedergegeben.

Tab.X: Färbeintensität für CEA in den Metastasen duktaler und lobulärer Carcinome in Beziehung zum Grading (L= lobulär)

|     | <u>G I</u> | <u>G II</u> | <u>G III</u> |
|-----|------------|-------------|--------------|
| -   | 1          | 4<br>1 L    | 4<br>1 L     |
| +   |            | 7           | 9<br>1 L     |
| ++  | 1          | 2           | 4            |
| +++ |            | 4           | 1 L          |

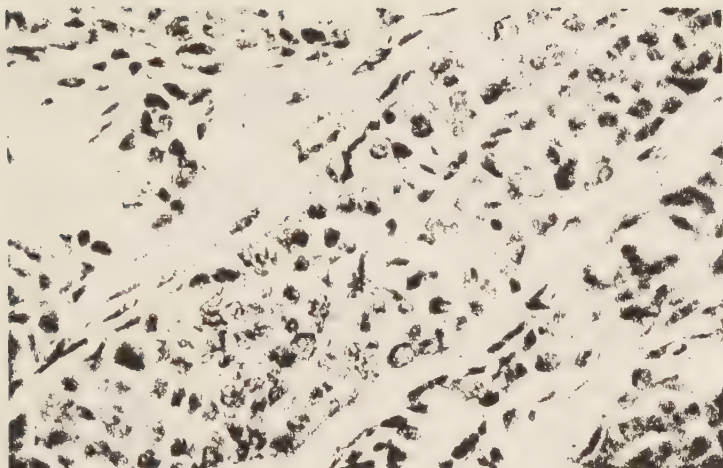


Abb.16: CEA Primärtumor mit schwach positiver Reaktion  
in ganz wenigen Zellen

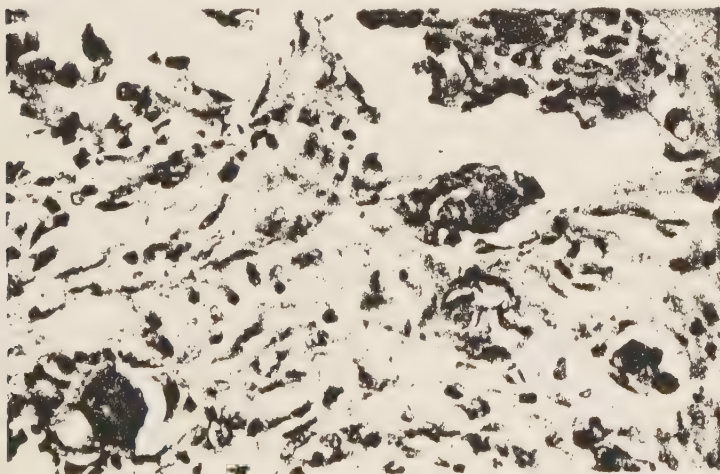


Abb.17: CEA Metastase mit gleichen Tumorzellen wie im Pri-  
märtumor (Abb.16) mit starker intracytoplasmati-  
scher Reaktion

3.7.3.1. Vergleich der Intensität des Reaktionsaus-  
falls für CEA in Primärtumoren und Metastasen  
in Beziehung zum histologischen Grad

Im Vergleich der Färbeintensitäten zwischen duktalem bzw. lobulärem Carcinom und ihren Metastasen fand sich in den Fällen mit Grad I nach Bloom bei den duktalem Primärtumoren ein Fall mit negativer Reaktion, der in der Metastase unverändert blieb.

Ein weiterer Fall mit schwach positiver Reaktion im Primärtumor wurde in der Metastase mittelstark positiv. In der Gruppe der Fälle mit Grad II nach Bloom zeigten sich neun duktalem Primärtumoren mit negativer Reaktion. In den Metastasen zeigten sich noch vier Fälle mit negativer Reaktion.

Ein lobuläres Carcinom mit negativer Reaktion im Primärtumor blieb in der Metastase unverändert.

Fünf duktalem Primärtumoren zeigten schwach positive Reaktion, in den Metastasen waren es sieben Fälle.

In der mittelstark positiven Gruppe blieben die Metastasen gegenüber den Primärtumoren unverändert.

Während nur ein duktalem Primärtumor stark positiv war und unverändert in der Metastase blieb, zeigte sich bei den Metastasen eine Zunahme von drei Fällen.

Bei den Fällen mit Grad III nach Bloom fanden sich neun duktalem Primärtumoren mit negativer Reaktion, in den Metastasen gab es noch vier negative Fälle.

Bei den lobulären Primärtumoren waren zwei Fälle negativ, in den Metastasen gab es noch ein negativer Fall, der andere Fall wurde in der Metastase schwach positiv.

Sieben duktalem Primärtumoren waren schwach positiv, in den Metastasen gab es eine Zunahme um zwei Fälle in der schwach positiven Reaktionsstärke.

Ein duktalem Primärtumor zeigte mittelstarke positive Reaktion, in den Metastasen waren es drei Fälle mit mittelstarker Reaktion.

Ein lobuläres Carcinom zeigte im Primärtumor stark positive Reaktion, die Metastase blieb unverändert.

### 3.8. Färbeintensität für CEA in Metastasen in Beziehung zur Stadienbestimmung der Primärtumoren

Die Größe und die Bestimmung der pT-Stadien bei den Primärtumoren wurde für die jeweiligen Metastasen übernommen.

Von den 36 dukталen Mammacarcinomen wiesen die Lymphknotenmetastasen der Primärtumoren und deren Stadium pTx eine mittelstarke und eine starke Reaktion auf. In den neun Fällen mit dem Stadium pT1 war die Mehrzahl der Lymphknotenmetastasen schwach, seltener negativ, mittelstark und stark positiv, 16 Fälle mit dem Stadium pT2 waren gleichmäßig in den Lymphknotenmetastasen verteilt, wobei die schwach positiven Reaktionen häufiger waren. Die vier Fälle im Stadium pT3 zeigten in den Lymphknotenmetastasen keine starke Reaktion, wie die fünf Fälle im Stadium pT4, in beiden Stadien lag eine gleichmäßige Reaktionsverteilung vor.

Von den vier lobulären Carcinomen wiesen die Lymphknotenmetastasen in einem Fall mit dem Stadium pT1 keine Reaktion; mit dem Stadium pT2 keine Reaktion, eine schwache und eine starke Reaktion auf.

Die Ergebnisse des Vergleichs der Färbeintensitäten mit dem Staging sind in Tabelle X1 angegeben.

Tab.X1: Färbeintensität für CEA in den Metastasen in Beziehung zur Stadienbestimmung der dukталen und lobulären Primärtumoren (L= lobulär)

|     | pTx | pT1      | pT2      | pT3 | pT4 |
|-----|-----|----------|----------|-----|-----|
| -   |     | 2<br>1 L | 4<br>1 L | 1   | 2   |
| +   |     | 5        | 7<br>1 L | 2   | 2   |
| ++  | 1   | 1        | 3        | 1   | 1   |
| +++ | 1   | 1        | 2<br>1 L |     |     |

3.8.1. Vergleich der Intensität des Reaktionsausfalls  
für CEA in Primärtumoren und Metastasen in Be-  
ziehung zur Stadienbestimmung der Primärtumoren

Im Vergleich der Färbeintensitäten in Beziehung zum Staging gab es bei den dukталen Primärtumoren in dem Stadium pTx zwei Fälle mit schwach positiver Reaktion, die in den Metastasen mittelstark bzw. stark positiv reagierten.

Im Stadium pT1 waren fünf duktale Primärtumoren negativ, in den Metastasen dagegen noch zwei Fälle negativ. Ein lobuläres Carcinom, im Primärtumor negativ, blieb in der Metastase unverändert.

Drei duktale Primärtumoren waren schwach positiv, in den Metastasen blieben fünf Fälle schwach positiv.

In der mittelstarken Reaktion gab es bei den Primärtumoren einen Fall, der in der Metastase unverändert blieb.

In der starken Reaktion gab es bei den Primärtumoren keinen Fall, bei den Metastasen einen Fall.

Im Stadium pT2 waren 11 duktale Primärtumoren negativ, in den Metastasen blieben noch vier Fälle mit negativer Reaktion.

Ein lobuläres Carcinom blieb im Primärtumor und Metastase unverändert negativ.

In der Gruppe der schwach positiven Fälle gab es vier duktale Primärtumoren, in den Metastasen sieben Fälle.

Ein lobuläres Carcinom, im Primärtumor negativ, wurde in der Metastase schwach positiv.

In der Gruppe der mittelstark positiven Fälle zeigte sich bei den Primärtumoren kein Fall, in den Metastasen waren es drei Fälle mit mittelstarker Reaktion.

Ein duktales Carcinom zeigte im Primärtumor starke Reaktion und blieb in der Metastase unverändert.

Ein lobuläres Carcinom, im Primärtumor stark positiv, blieb ebenfalls in der Metastase unverändert.

Im Stadium pT3 und pT4 gab es keine Veränderung zwischen dem Reaktionsausfall in Primärtumoren und Metastasen.

3.9. Färbeintensität für CEA in den Metastasen in  
Beziehung zur histologischen Struktur

Die histologische Struktur wurde wie beim Primärtumor nach soliden und scirrösen Wachstum, nach drüsigen und nicht drüsigen Strukturen eingeteilt und in allen Fällen vom Primärtumor übernommen.

Von den 36 duktalem Mammacarcinomen wiesen die Lymphknotenmetastasen in 28 Fällen solide Verbände auf, die überwiegend schwache und negative, aber auch mittelstarke und starke Reaktion zeigten. Von den Lymphknotenmetastasen der acht duktalem Carcinome mit scirrösen Verbänden war die Mehrzahl schwach, selten negativ, mittelstark und stark positiv.

Von den 36 duktalem Mammacarcinomen wiesen die Lymphknotenmetastasen in 17 Fällen drüsige Strukturen auf, die überwiegend schwache und negative, wenig stark positive Reaktion zeigten.

Die 19 Fälle mit nicht drüsigen Strukturen waren schwach und mittelstark positiv, weniger negativ und selten stark positiv.

Von den vier lobulären Carcinomen zeigten die Lymphknotenmetastasen mit scirrösen Strukturen negative, schwache und stark positive Reaktion. Die Metastasen mit drüsigen Strukturen waren negativ und schwach positiv, die Metastasen mit nicht drüsigen Strukturen negativ und stark positiv.

Die Ergebnisse des Vergleichs der Färbeintensitäten mit der histologischen Struktur ist in Tab. XII gezeigt.

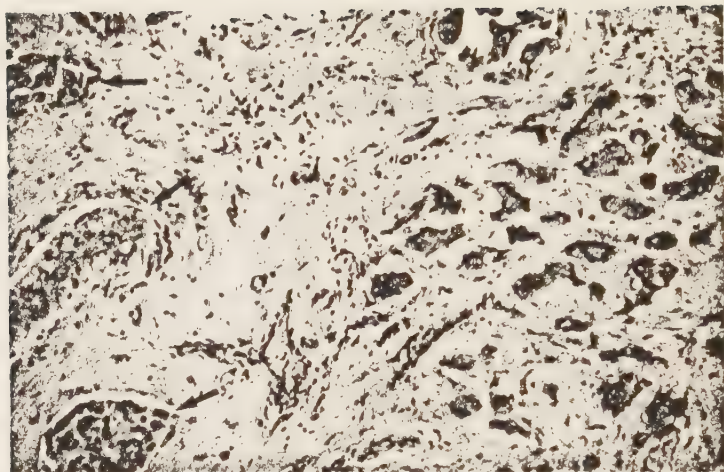


Abb.18: CEA Primärtumor mit teils positivem teils negativem - heterogenem Reaktionsmuster (s. Pfeile)

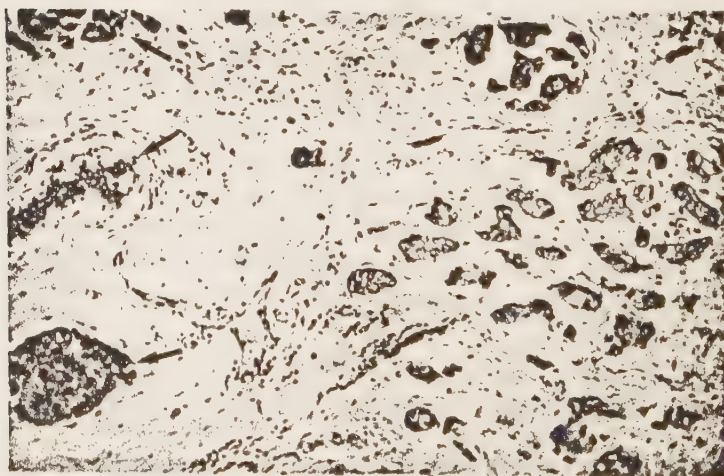


Abb.19: TPA Primärtumor im Vergleich zur Abb. 18, gleiche Stelle mit starker intracytoplasmatischer - homogener Reaktion, TPA luminal zugeordnet (s. Pfeile)

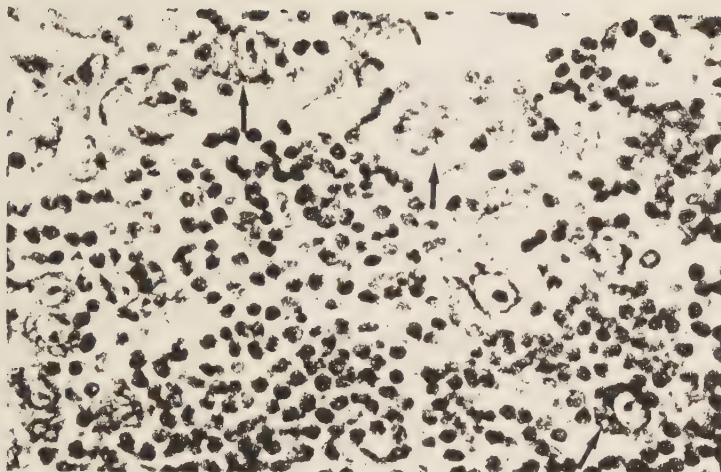


Abb. 20: CEA Lymphknotenmetastase des Primärtumors in Abb.18 mit positiven und negativen Arealen (s. Pfeile) bei morphologisch gleichen Zellen - heterogen positiv

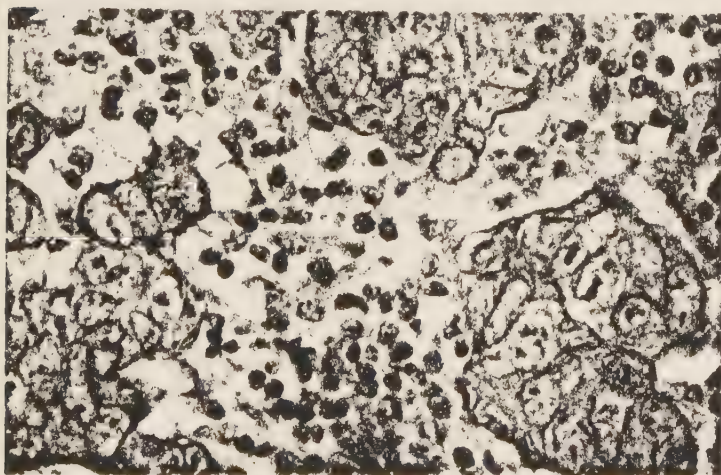


Abb. 21: TPA Lymphknotenmetastase des Primärtumors in Abb.19; im Vergleich zur Abb.20 mit homogenem Färbemuster

Tab.XII: Färbeintensität für CEA in den Metastasen duk-  
taler und lobulärer Carcinome in Beziehung zur  
histologischen Struktur (L= lobulär)

Metastasen duktaler und lobulärer Carcinome

|     | <u>solid</u> | <u>scirrhös</u> | <u>drüsig</u> | <u>nicht drüsig</u> |
|-----|--------------|-----------------|---------------|---------------------|
| -   | 8            | 1<br>2 L        | 6<br>1 L      | 3<br>1 L            |
| +   | 11           | 5<br>1 L        | 7<br>1 L      | 9                   |
| ++  | 6            | 1               | 1             | 6                   |
| +++ | 3            | 1<br>1 L        | 3             | 1<br>1 L            |

3.9.1. Vergleich der Intensität des Reaktionsausfalls  
für CEA in Primärtumoren und Metastasen in  
Beziehung zur histologischen Struktur

Im Vergleich der Färbeintensitäten gab es in Beziehung zur histologischen Struktur bei den Metastasen und ihren dukталen soliden Primärtumoren überwiegend schwach positive und negative Fälle, bei den schwach positiven zeigte sich in den Lymphknotenmetastasen ein Fall mehr, in der größeren Gruppe der negativen Fälle, zeigte sich in den Lymphknotenmetastasen eine Abnahme um sieben Fälle, die sich in schwach positive (1), mittelstark positive (4) und starke Reaktionsintensitäten verteilten (2) und die somit um diese Zahlen in ihren Gruppen zunahmen.

Bei den duktal, scirrhösen Primärtumoren und ihren Metastasen zeigte sich in den negativen Reaktionsaus-

fällen eine Abnahme von vier Fällen bei Metastasen der duk-talen, scirrhösen Primärtumoren, bei den Metastasen der lobulären Primärtumoren fand sich ein Fall weniger.

In der Gruppe der mittelstark positiven Fälle gab es in den Metastasen drei Fälle duktaler Primärtumoren und einen Fall eines lobulären Primärtumors mehr.

Die mittelstark positiven Primärtumoren und ihre Metasta-sen blieben unverändert.

Bei der stark positiven Reaktionsstärke fand sich bei den Metastasen der dukteren Primärtumoren ein Fall mehr.

Von den 36 dukteren Mammacarcinomen wiesen die Lymphkno-tenmetastasen in 17 Fällen drüsige Strukturen auf, die wie die Fälle mit nicht drüsigen Strukturen hauptsächlich nega-tiv waren. Bei den Fällen mit drüsigen Strukturen gab es eine Abnahme in den Metastasen um vier Fälle, die sich in schwach positive (3) und starke (2) Reaktionsausfälle verteilten. Bei der mittelstarken Reaktion gab es eine Abnahme in den Metastasen, im Gegensatz zu den nicht drüsigen Strukturen, die in der mittelstarken Reaktion eine Zunahme von fünf Fällen in den Metastasen zeigten. In der negativen Reaktion nahmen die nicht drüsigen Strukturen um sieben Fälle in den Metastasen ab, bei den schwach positiven ein Fall mehr in den Metastasen.

## 2. Auswertung

### 3.10. Überblick über Homogenitäten bzw. Heterogenitäten des immunhistochemischen Reaktionsausfalls in Primärtumoren und Metastasen

Während in den vorherigen Abschnitten die Bewertung des Reaktionsausfalls, der Färbeintensität, über den gesamten Tumor bzw. Metastase in Beziehung zu den verschiedenen Parametern untersucht wurde, erfolgt hier eine Darstellung der Untersuchungen über das Verteilungsmuster jeweils innerhalb eines Primärtumors und der Lymphknotenmetastase.

Es zeigte sich nämlich, daß innerhalb einer Tumorfornation Tumorzellen positiv oder negativ reagierten und zugleich noch in verschiedenen Reaktionsintensitäten. Deshalb stellte sich die Frage, ob sich nicht möglicherweise bei diesen festgestellten Unterschieden Beziehungen zu den verschiedenen biologischen Parametern zeigen, wobei diese Untersuchungen jeweils für Primärtumoren und Metastasen getrennt vorgenommen wurden und sowohl die immunhistochemischen Reaktionen für TPA als auch für CEA entsprechend analysiert wurden.

Wie in der Methodik ausgeführt, wurden dabei folgende Bewertungskategorien verwandt:

Mit dem Begriff homogen (gleichmäßig positiv):

wenn mehr als 50 % der gefärbten Zellen nur eine Färbeintensität hatten;

heterogen (ungleichmäßig positiv):

wenn mehr als 50 % der Zellen gefärbt, aber mehrere unterschiedliche Färbeintensitäten dabei aufwiesen;

teilweise negativ:

wenn weniger als 50 % (meist weniger als 30 %) der Tumorzellen eine positive immunhistochemische Reaktion aufwiesen;

negativ:

wenn keine Zellen eine Reaktion zeigte (dies kommt für CEA in Betracht).

### 3.10.1. Überblick über Homogenität bzw. Heterogenität bei Primärtumoren im Färbemuster für TPA

Keiner der dukталen wie lobulären Primärtumoren war völlig negativ.

Die Mehrzahl der Fälle war gleichmäßig (13) bzw. ungleichmäßig (16) positiv.

Ungefärbte Bezirke wurden in 11 Primärtumoren gesehen, sie wurden als teilweise negativ beurteilt.

### 3.10.2. Homogenität bzw. Heterogenität in Primärtumoren für TPA in Beziehung zum Grading

Bei den Primärtumoren mit Grad I nach Bloom zeigten die dukталen Primärtumoren in beiden Fällen heterogenes Färbemuster für TPA, die dukталen wie lobulären Primärtumoren in Grad II gleiche Anzahl (fünf) von Fällen die homogen und teilweise negativ (nach obiger Definition) waren.

Ein Primärtumor mehr (sechs) als in der homogenen Gruppe zeigte heterogenes Färbemuster.

In dukталen wie lobulären Primärtumoren mit Grad III nach Bloom zeigte die überwiegende Zahl der Fälle (neun von 20) homogenes Färbemuster, heterogenes Färbemuster in sieben Fällen und weniger (vier) Fälle fanden sich in der Gruppe der teilweise negativen Fälle.

Die statistische Prüfung (Student Test) zeigt keinerlei signifikante Beziehung zwischen Färbemusterkategorien (s.o.) und dem histologischen Grad der Primärtumoren ( $p = 0,229$ ) (s. Tab. XIII).

Tab. XIII: Homogenitäten bzw. Heterogenitäten in Primärtumoren und Metastasen für TPA

|               | Primärtumoren |      |       | Metastasen  |      |       |
|---------------|---------------|------|-------|-------------|------|-------|
|               | G I           | G II | G III | G I         | G II | G III |
| $\geq 50\% +$ | 0             | 6    | 8     | 2           | 10   | 15    |
| $\leq 50\%$   | 2             | 7    | 7     | 0           | 8    | 4     |
| $\geq 50\% -$ | 0             | 6    | 4     | 0           | 1    | 0     |
| p = 0,22 NS   |               |      |       | p = 0,35 NS |      |       |

|               | Primärtumoren |     |     |     |     | Metastasen  |     |     |     |     |
|---------------|---------------|-----|-----|-----|-----|-------------|-----|-----|-----|-----|
|               | pTx           | pT1 | pT2 | pT3 | pT4 | pTx         | pT1 | pT2 | pT3 | pT4 |
| $\geq 50\% +$ | 0             | 3   | 7   | 3   | 0   | 1           | 7   | 13  | 2   | 4   |
| $\leq 50\%$   | 1             | 6   | 6   | 0   | 3   | 0           | 3   | 6   | 2   | 1   |
| $\geq 50\% -$ | 1             | 1   | 6   | 1   | 2   | 1           | 0   | 0   | 0   | 0   |
| p = 0,19 NS   |               |     |     |     |     | p = 0,81 NS |     |     |     |     |

|             | duktal |   |   |         |   |   | lobulär |   |   | duktal |   |   |         |   |   | lobulär |   |   |
|-------------|--------|---|---|---------|---|---|---------|---|---|--------|---|---|---------|---|---|---------|---|---|
|             | solid  |   |   | scirrh. |   |   |         |   |   | solid  |   |   | scirrh. |   |   |         |   |   |
| ≥ 50% +     | 1      | 5 | 4 | 2       | 0 | 2 | 0       | 0 | 1 | 7      | 6 | 6 | 2       | 0 | 4 | 0       | 0 | 2 |
| ≤ 50%       | 2      | 6 | 4 | 2       | 1 | 0 | 0       | 1 | 0 | 0      | 4 | 4 | 1       | 1 | 0 | 0       | 2 | 0 |
| ≥ 50% -     | 0      | 3 | 3 | 1       | 0 | 0 | 0       | 1 | 1 | 0      | 0 | 1 | 0       | 0 | 0 | 0       | 0 | 0 |
| p = 0,64 NS |        |   |   |         |   |   |         |   |   |        |   |   |         |   |   |         |   |   |
| p = 0,86 NS |        |   |   |         |   |   |         |   |   |        |   |   |         |   |   |         |   |   |

### 3.10.3. Homogenität bzw. Heterogenität in Primärtumoren für TPA in Beziehung zum Staging

Die Tumoren im Stadium pTx zeigten eine gleiche Aufteilung zwischen heterogenem und teilweise negativem Färbemuster.

Im Stadium pT1 war nur einer von 10 Fällen, im Stadium pT2 gab es sechs teilweise negative Fälle von insgesamt 19 Fällen.

In der Gruppe der heterogenen Fälle zeigte sich die gleiche Anzahl von Fällen im Stadium pT1 und pT2, bei den homogenen fanden sich im Stadium pT1 drei Fälle, im Stadium pT2 sieben Fälle.

Im Stadium pT3 gab es drei homogene Fälle und einen teilweise negativen Fall.

Die Verteilung im Stadium pT4 zeigte zur Hälfte heterogene und teilweise negative Fälle, es gab keinen homogenen Fall.

Die statistische Prüfung zeigte keinerlei signifikante Beziehung zwischen den Färbemusterkategorien und den Stadienbestimmungen der Primärtumoren ( $p = 0,19$ ).

(Siehe Tabelle XIII)

### 3.10.4. Homogenität bzw. Heterogenität in Primärtumoren für TPA in Beziehung zur histologischen Struktur

Die meisten Primärtumoren waren überwiegend solid gebaut, bei fast gleicher Verteilung von homogenem (10) und heterogenem (12) Färbemuster, sechs Fälle waren teilweise negativ, die meisten Carcinome in den teilweise drüsigen und gering drüsigen Strukturen zeigten ein heterogenes Reaktionsmuster.

Bei den duktal scirrhösen Carcinomen waren von acht Fällen die Hälfte, mit drüsigen und nicht drüsigen Strukturen, homogen. Heterogen waren die drüsigen und gering drüsigen Tumorabschnitte; teilweise negativ war

ein weiterer Fall im Bereich drüsiger Strukturdifferenzierung.

Eine etwas andere Verteilung fand sich bei den lobulären Primärtumoren, bei denen ein scirrhöses, nicht drüsiges Carcinom homogen, jeweils ein nicht drüsiges und gering drüsiges teilweise negativ, ein weiteres gering drüsiges Carcinom heterogen war.

Eine statistisch nachweisbare Beziehung zwischen diesen in den Primärtumoren oft unterschiedlichen histologischen Differenzierungserscheinungen zu den unterschiedlichen Färbemusterkategorien fand sich nicht ( $p = 0,64$ ). (s. Tabelle XIII)

### 3.11. Homogenität bzw. Heterogenität in Metastasen für TPA

Allgemein war eine Abnahme ungefärbter Areale zu beobachten, es gab bei 40 Fällen nur einen teilweise negativen Fall in den Metastasen bei 10 teilweise negativen Fällen in den Primärtumoren.

39 Metastasen duktaler und lobulärer Carcinome zeigten mit 27 Fällen homogenes und in 12 Fällen heterogenes Färbemuster; die Primärtumoren zeigten 13 homogene und 16 heterogene Fälle.

(s. Tabelle XIII)

#### 3.11.1. Homogenität bzw. Heterogenität in Metastasen für TPA in Beziehung zum Grading und Staging

Der einzige teilweise negative Fall in den Metastasen stammt von einer Metastase eines dukталen Carcinoms in Grad III nach Bloom.

Die Mehrzahl der Fälle (27) war homogen, davon die Grad III-Gruppe mit 15 Fällen.

Im Vergleich zum Primärtumor sieht man eine deutliche

Zunahme der homogen Fälle, 27 in den Metastasen, 14 in den Primärtumoren.

Die Verteilung der Färbemuster für TPA in Metastasen in Beziehung zum Grading war nicht signifikant ( $p = 0,35$ ).

Eine analoge Analyse in Beziehung zum Tumorstadium (Staging) wurde durchgeführt, auch hierbei ergab sich keine signifikante Beziehung ( $p = 0,81$ ).

Analog zum Vorgehen bei den Primärtumoren wurde auch bei den Metastasen geprüft, ob sich zwischen der histologischen Struktur differenzierung und Färbemuster Beziehungen finden lassen, dies trifft nicht zu und entsprechend zeigte die statistische Überprüfung keinerlei Signifikanz.

### 3.12. Homogenität bzw. Heterogenität bei Primärtumoren und Metastasen beim Reaktionsausfall für CEA

Ebenso wie oben für TPA geschildert, wurde auch beim immunhistochemischen Nachweis für CEA versucht zu prüfen, ob Besonderheiten durch die Unterkategorisierung in homogenen und heterogenen Reaktionsausfall in Primärtumoren und Metastasen zutage treten.

Dabei wurde ebenso wie für TPA die Beziehung dieser unterschiedlichen Reaktionsausfälle zum jeweiligen histologischen Grad, Tumorstadium und histologischer Struktur geprüft.

Als entscheidender Unterschied zu TPA wiesen von den 40 analysierten Fällen nur sechs Fälle eine homogene und sieben Fälle eine heterogene Intensität in den Primärtumoren auf, alle übrigen Fälle waren teilweise negativ und negativ. Diese kleine Zahl wird bei der weiteren Aufschlüsselung wie etwa Stadienbestimmung oder Gradbestimmung soweit untergliedert, daß nur noch ein bis drei Fälle in jeder Kategorie vorlagen. Deshalb wurde keine statistische Überprüfung vorgenommen und das Ergebnis wird numerisch

berichtet.

Etwa die Hälfte der verbliebenen positiv reagierenden Primärtumoren zeigte ein homogenes, die andere Hälfte ein heterogenes Reaktionsmuster bei der Aufschlüsselung nach den histologischen Graden, ohne daß irgendeine tendenzielle Bewertung, z.B. je drei Fälle homogen in Grad II und Grad III Tumoren und je drei Fälle heterogen für die gleichen histologischen Gradgruppen, ein Fall heterogen für Grad I, möglich gewesen wäre.

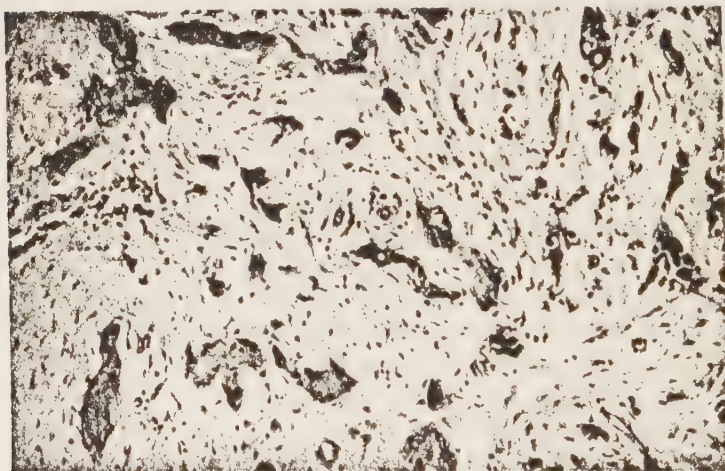


Abb.22: CEA Primärtumor mit positiven und negativen Arealen bei morphologisch gleichen Zellen

Für die Tumorstadien pT1 bis pT4 verkleinerten sich die Einzelzahlen noch weiter, so daß auch die einzelnen Tumorstadien gleichmäßig verteilt zwischen homogenem und heterogenem Reaktionsmuster vorkommen.

Für die Beziehung der Reaktionsmuster zu den histologischen Strukturtypen ergibt sich eine fast gleichmäßige Streuung, wobei hier noch dazukommt, daß die histologischen Bautypen zugunsten solid wachsender Tumoreareale einseitig verschoben sind.

Für die Metastasen gilt, daß von 22 CEA-negativen Pri-

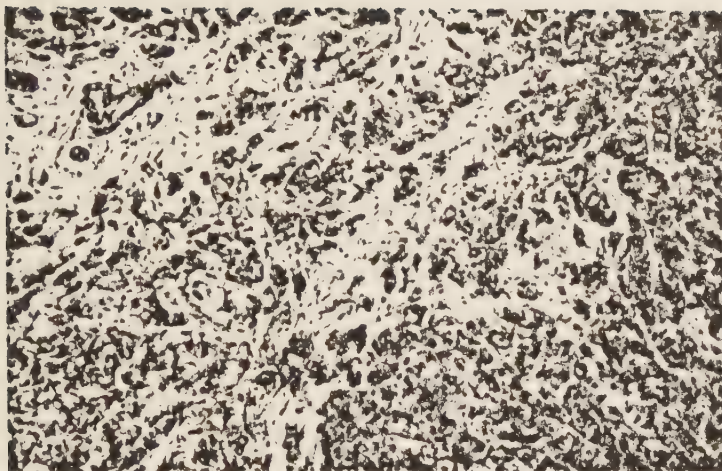


Abb.23: CEA Lymphknotenmetastase des Primärtumors in Abb.22, homogen positiv

märtumoren nur acht negative Lymphknotenmetastasen zeigten, während in 14 Fällen die Metastasen bei negativen Primärtumoren CEA positiv waren.

Umgekehrt zeigten von den 13 CEA-negativen Primärtumoren drei Metastasen keine CEA-Reaktion.

Bei der Prüfung, ob sich in den Metastasen, die positiv reagierten, Unterschiede hinsichtlich des Reaktionsausfallmusters homogen und heterogen erkennen lassen, ist festzustellen, daß auch hier ein Überwiegen der teilweise negativen und negativen Fälle zu beobachten ist, das homogene Färbemuster findet sich in zwei Fällen mehr als die heterogene Färbeintensität, doch sind die Unterschiede so gering, daß sich eine statistische Überprüfung erübrigte.

Auch für die Metastasen gilt, daß sich keine Beziehungen zu dem histologischen Grad, Tumorstadium und histolo-

gischen Bautyp erkennen lassen.

Die Darstellung dieses gesamten Abschnittes erfolgte, um zu dokumentieren, daß die Reaktionsmuster für CEA vergleichbar für TFA geprüft, jedoch keinerlei erkennbare Beziehungen festgestellt wurden. Dies erscheint wichtig, weil, wie in einem früheren Abschnitt festgestellt wurde, Unterschiede in der Reaktionsintensität bzw. Reaktivität zwischen Primärtumor und Metastasen bestehen; sie korrelieren aber nicht mit den hier besprochenen Reaktionsmustern. Dieses Ergebnis ist zu betonen, da bei der Entstehung von metastatischen Tumorzellen Unterschiede zwischen Primärtumoren und Metastasen hätten auftreten können.

#### 4. DISKUSSION

Wie in der Einleitung ausgeführt, war die eigentliche Zielsetzung der vorliegenden Arbeit der Nachweis und die vergleichende Bestimmung des TPA sowie des CEA in Primärtumoren und den axillären Lymphknotenmetastasen, sowie die Frage, ob es einen Unterschied in der Antigen-Reaktivität zwischen Primärtumoren und deren Metastasen gibt, und schließlich, ob TPA und CEA sich untereinander in ihrem Reaktionsverhalten in Primärtumoren und/oder Lymphknotenmetastasen unterscheiden.

Tab.XIV: Vergleich der CEA-Färbeintensität in Primärtumor und Metastase bei 40 Mammacarcinomfällen.

|           |        | Primärtumor |    |    |     |
|-----------|--------|-------------|----|----|-----|
| Metastase | n = 40 | 22          | 13 | 3  | 2   |
|           |        | -           | +  | ++ | +++ |
|           |        | 3L          |    |    | 1L  |
|           | 11     | 8           | 2  | 1  | -   |
|           | -      | 2L          |    |    |     |
|           | 17     | 11          | 5  | 1  | -   |
| Metastase | +      | 1L          |    |    |     |
|           | 7      | 1           | 5  | 1  | -   |
|           | ++     |             |    |    |     |
|           | 5      | 2           | 1  | -  | 2   |
| Metastase | +++    |             |    |    | 1L  |

(L = lobulär)

Tab. XV: Vergleich der TPA-Färbeintensität in Primärtumor und Metastase bei 40 Mammacarcinomfällen

|           |     | Primärtumor |    |     |
|-----------|-----|-------------|----|-----|
| n = 40    |     | 15          | 18 | 7   |
|           |     | +           | ++ | +++ |
|           |     | 2I.         | 1L | 1L  |
| Metastase | 11  | 4           | 1  | 1   |
|           | +   |             |    |     |
|           | 22  | 9           | 11 | 2   |
|           | ++  | 1L          | 1L |     |
|           | 12  | 2           | 6  | 4   |
|           | +++ | 1L          |    | 1L  |

(L= lobulär)

Vor einer Diskussion der dabei gewonnenen Ergebnisse ist es aber zunächst notwendig, die Ergebnisse an den Primärtumoren, die diesem Vergleich zugrunde liegen, für sich zu besprechen.

Dies gilt in erster Linie für das polyclonale CEA, da hier eine ganze Reihe vergleichbarer Untersuchungen bereits vorliegen, die Ergebnisse aber auffällig diskrepant sind.

So zeigt sich, daß Goldenberg (1976) in einer Untersuchung an 18 Mammacarcinomen mit immunhistochemischen Methoden keine positive Reaktion feststellte.

Eine spätere Arbeit (Goldenberg 1978) zeigt einen positiven Fall von insgesamt 62 untersuchten Mammacarcinomen. Dieses Ergebnis liegt deutlich niedriger als die von uns erhobenen Befunde in denen sich in 40 Primärtumoren 18 positive Fälle (45 %) fanden, während 22 Fälle (55 %) als negativ beurteilt werden mußten. Wahren (1978) und Walker (1980) fanden dagegen etwa den gleichen Prozentsatz an positiven und negativen Mammacarcinomen beim Nachweis von CEA, nämlich 45 po-

sitive Fälle von 90 untersuchten (50 %), die übrigen 45 Fälle waren negativ (50 %), bei Wahren fanden sich in 21/50 Fällen (42 %) positive, alle übrigen waren negativ.

Jüngst berichtet Böcker (1985) über die Untersuchung von 120 Mammacarcinomen, die in 50 % der Fälle eine positive Reaktion für CEA zeigten.

Einen wesentlich höheren Wert stellten Heydermann (1977) mit 10/12 positiven Mammacarcinomen (81 %), Shousha (1978), v. Kleist (1982) und Björklund und v. Kleist (1982), fest; bei Shousha waren von 74 Mammacarcinomen 49 Fälle positiv (66 %), alle restlichen negativ, bei allen 32 untersuchten Mammacarcinomen zeigten sich bei Björklund und v. Kleist (1982) alle positiv (100 %). v. Kleist (1982) fand in 90/108 Fällen (90 %) CEA-positive Mammacarcinome, Wittekind (1984) fand positive Reaktionsausfälle in 38 von 48 Fällen (77 %), die übrigen 10 Fälle zeigten keine Reaktion (33 %).

Sucht man eine Erklärung für diese so unterschiedlichen Ergebnisse, so erscheint es offenkundig, daß zu einem wesentlichen Teil technische Gründe hierfür verantwortlich sein dürften.

Dies gilt vor allem für die sehr niedrigen Werte von Goldenberg, wobei nicht zu klären ist, ob Probleme, wie z.B. Vorbehandlung der Gewebe für die immunhistochemische Reaktion oder die verwendeten, in dem Fall nicht absorbierten Antiseren, hierfür verantwortlich sind. Wesentlich wichtiger ist die Frage, wieso einige Autoren, wie eben dargestellt, in einem wesentlich höheren Prozentsatz Primärtumoren als positiv für CEA bezeichnet haben. Vergleicht man die technischen Bedingungen, so stellt sich heraus, daß Shousha (1978), v. Kleist (1982), Björklund und v. Kleist (1982), Wittekind (1984) dasselbe kommerzielle polyclonale Antiserum verwendet haben wie wir, die Ergebnisse somit gleichartig sein sollten. Es zeigt sich aber ein wichtiger Unterschied, daß

nämlich, wie in der Methodik ausgeführt, das verwendete kommerzielle Antiserum vorher mit NCA (Lamerz) absorbiert wurde, wie bei Böcker (1985), ähnlich wie bei Walker (1980), dort allerdings nur absorbiert mit Milzextrakten, während die oben zitierten Autoren das kommerzielle Antiserum ungereinigt einsetzten, so daß mit einer zusätzlichen positiven Reaktion durch Beimischung durch dieses Antiserum gerechnet werden muß. Zudem ist CEA von diesen Autoren (Shousha, Björklund und v. Kleist, v. Kleist und Wittekind) in höheren Konzentrationen eingesetzt worden, was ebenfalls bezogen auf die Sicherheit der Aussagen problematisch ist. Daß diese Vermutung begründet ist, ergibt sich aus dem Vergleich mit anderen Bestimmungsverfahren für CEA in Primärtumoren (s.Text.)

Bauer (1985) hat nämlich 26 Mammacarcinome biochemisch auf den Gehalt von CEA im Gewebe untersucht und stellte dabei fest, daß hierbei die Werte von 48 ng bis 48000 ng CEA/g TG schwankten. Der Vergleich des CEA-Gehaltes in carcinomatösen Mammageweben mit normalem Mammagewebe zeigt, daß auch in normalem Mammagewebe die Werte nicht unbeträchtlich schwanken und es steht fest, daß nach diesen biochemischen Messungen die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen carcinomatösen Gewebes mit der ansteigenden Konzentration des CEAs korreliert.

Sieht man die in dieser Arbeit angegebenen Werte bis 1600 ng CEA/g TG, so zeigt sich fünf mal mehr normales Gewebe als Tumorgewebe, bei Werten bis 8000 ng CEA/g TG 2,5 mal mehr normales Gewebe und bei Werten über 8000 ng CEA/g TG fünf mal mehr carcinomatöses Gewebe als Normalgewebe, was einen Unterschied zwischen Carcinomgewebe und normalem Gewebe deutlich macht. Nimmt man das ungefähre Mittel von 4700 ng CEA/g TG, so zeigt sich, daß etwa 50 % der von Bauer untersuchten Mammacarcinome Werte über diesem Mittelwert von

CEA zeigen. Dies würde aber den immunhistochemischen Verteilungswert von Walker (1978) und Wahren (1980) und eigenen Ergebnissen etwa entsprechen. Er fand weiterhin keinen linearen Zusammenhang zwischen Gewebe- und Serumkonzentration, keine Beziehung zwischen metastasiertem und nicht metastasiertem Mammacarcinomgewebe, jedoch Unterschiede in den Serumkonzentrationen bei soliden und scirrhösen Carcinomen einerseits und anaplastischen Carcinomen andererseits. Im Gegensatz dazu findet sich bei uns, wie in den Ergebnissen dargestellt, Tabelle IX (bzw. XII für die Metastasen), keine Beziehung weder im positiven noch im negativen Sinne zu den jeweils zugrunde liegenden histologischen Bautypen des Mammacarcinoms. Zu exakt dem gleichen Ergebnis kommt Bauer (1985), nach dessen Untersuchungen sich zwischen der Höhe der CEA-Konzentration im Gewebe und in verschiedenen Mammacarcinomtypen keine signifikante Beziehung aufstellen läßt. Zu dem gleichen Schluß kamen auch Wahren (1978), Shousha (1978), Walker (1980), Mansour (1980), v. Kleist (1982), die ebenfalls keine Beziehung zwischen histologischem Tumortyp und dem immunhistochemischen Reaktionsausfall herstellten.

Gegensätzlich sind die Ergebnisse von Böcker (1985), der eine Korrelation zwischen CEA-Positivität und histologischem Tumortyp findet.

Ausgehend von der Überlegung, bzw. dem Vorbehalt, daß die bekannte Einteilungsproblematik und Erfassung der histologischen Bautypen der Mammacarcinome vielleicht Ursache für die Nicht-Übereinstimmung sein könnte, weil eine nicht unerhebliche Gruppe von histologischen Charakteristika wie scirrhöses oder solides Baumuster doch subjektiven Bewertungsschwankungen unterliegen, wurde in der vorliegenden Arbeit geprüft, ob sich nicht zu anderen wohldefinierten Tumorkriterien Beziehungen zum jeweiligen immunhistochemischen Reaktionsausfall herstellen lassen.

So wurde, wie in Tab. VII (bzw. Tab. X für die jeweiligen Metastasen) dargestellt, geprüft, ob zwischen dem nach der Methode von Bloom bestimmten histologischen Grad, unabhängig von dem jeweiligen histologischen Typ, Beziehungen zum Reaktionsausfall bei dem CEA-Nachweis herstellbar sind. In diese histologische Gradbestimmung geht immerhin die sehr exakte Messungen der Mitosezahl ein. Es zeigt sich aber, daß auch beim Vergleich dieser Parameter, wie histologischer Grad gegenüber CEA-Nachweis, keine Beziehung besteht. Zu dem gleichen Ergebnis kommen Wahren (1978), Mansour (1980), gegensätzlich sind die Resultate von Böcker (1985) mit einer Übereinstimmung von CEA-Positivität und höheren histologischen Graden. Es wäre naheliegend gewesen, daß mit fortschreitender Tumorgröße Beziehungen zum negativen CEA-Nachweis bestehen, wie in Arbeiten von Walker beschrieben. Dort wird der Grad I mit 69 % positiver Fälle beschrieben, dagegen bei Grad II nur noch 60 % und bei Grad III 32 % der Fälle mit positiver CEA-Reaktion. Deshalb wurde wie in Tabelle VIII (bzw. Tab. XI für die jeweiligen Metastasen) dargestellt, auch die Stadienbestimmung in Beziehung zu den Reaktionsausfällen mit CEA überprüft, die Ergebnisse zeigen eindeutig, daß auch hier keinerlei Beziehung besteht, in Übereinstimmung mit Arbeiten von Mansour (1980) und v. Kleist (1982).

Die Signifikanz der erhaltenen Daten wurde überprüft, es besteht keine Signifikanz. Um dieser Aussage ganz sicher zu sein, wurde in einer weiteren Untersuchungsreihe in der vorliegenden Arbeit der Ergebnisausfall der immunhistochemischen Reaktion mit CEA noch weiter aufgeschlüsselt.

Es erschien notwendig, den summarisch angegebenen Intensitätsgrad des immunhistochemischen Ausfalls noch weiter zu überprüfen. Irrtümliche Bewertungen hätten dadurch entstehen können, daß einerseits ein schwacher, aber mit allen Tumorzellen gleichmäßiger Reaktions-

ausfall verglichen wird mit Primärtumoren, in denen ein Teil der Tumorzellen einen eindeutig positiven Reaktionsausfall zeigt, während andere Abschnitte des Primärtumors eindeutig negative Tumorzellen aufweisen (s. Abb.18).

Es wurde deshalb zusätzlich zu den rein quantitativen Angaben auch das Verteilungsmuster des erhaltenen positiven Tumors in die Bewertung mit einbezogen. Wie dargestellt, zeigt sich hierbei, daß die Reaktionsunterschiede (z.B. gleichmäßig positiv, (homogen) oder ungleichmäßig positiv (heterogen) wie in der Auswertungsmethodik dargestellt) in keinerlei signifikanter Beziehung zu den histologischen Bautypen, die zudem noch aufgeschlüsselt wurden; keinerlei Beziehung zu dem unterschiedlichen Ausfall der immunhistochemischen Reaktion bei den Primärtumoren und in gleicher Weise keine Beziehung zu den jeweiligen Graden nach Bloom, dem Tumorstadium oder den histologischen Typ des Mammacarcinoms.

Wie bereits in den Ergebnissen gezeigt wurde, fanden sich drei häufigere Färbemuster, die intrazelluläre Reaktion als "cytoplasmatisch" bezeichnet, die an die Zellmembran kondensierte Färbereaktion "membranös" und die polarisierte Form mit Kondensation am oberen oder unteren Zellpol (Abb.15).

Diese Beobachtungen stimmen mit denen von Shousha (1978) weitgehend überein. Wie wir beobachteten andere eine lineare Anfärbung entlang der Zelloberfläche und dem luminalen Rand von Drüsen (Walker 1980) und Acini, ein weiterer Hinweis für technische Unterschiede, zeigt sich in der starken intracytoplasmatischen Reaktion von Histiozyten und Mastzellen, die wir nie beobachteten. Starke Färbungen fanden sich in der invadierenden Zone des Tumors (Shousha). Wie bei Wahren (1978) fanden sich auch bei uns keine morphologischen Unterschiede im Färbemuster.

Diffuse intracytoplasmatische Färbung in Arealen des Tumors, wo sich solide Gruppen formten (Walker) konnten wir generell nicht beobachten.

Es fanden sich in einem Tumor Unterschiede in Färbintensität, in dem Zellen positiv waren, danebenliegende Zellen ohne morphologische Unterschiede negativ blieben (v. Kleist), eine Beobachtung, die wir bestätigen können (Abb.22).

Wenden wir uns dem folgenden Abschnitt in der Diskussion zu, nämlich der vergleichenden Auswertung der immunhistochemischen Darstellbarkeit von CEA und TPA im Primärtumor und den axillären Lymphknotenmetastasen, so ist vorzustellen, daß erstaunlicherweise Untersuchungen dieser Art nur äußerst selten durchgeführt worden sind. Vor Beginn der eigenen Untersuchungen ist nur die Arbeit von Shousha zu erwähnen. Diese Arbeit bezieht sich nur auf den Nachweis von CEA, untersucht wurden hierbei 74 Primärtumoren, von denen 49 (66 %) positiv waren, 25 (44 %) zeigten keine positive Reaktion für CEA.

Von den 49 positiven Fällen hatten nur 19 Fälle Lymphknotenmetastasen, diese zeigten alle eine positive Reaktion.

Für die Interpretation dieser Befunde ist festzuhalten, daß nur die 19 Fälle mit Lymphknotenmetastasen mit unseren eigenen Untersuchungsreihen mit 40 Fällen zu vergleichen sind. Bereits oben wurde aber ausgeführt, daß die Problematik dieser von Shousha erhobenen Werte darin besteht, daß die verwandten polyclonalen Antiseren für CEA nicht absorbiert worden sind, so daß schwer abzuschätzen ist, in wieweit nicht die hohen positiven Werte auf Reaktion mit NCA zurückzuführen sind. Die zweite Arbeit, die sich mit der gleichzeitigen Untersuchung von Primärtumoren und Metastasen und wiederum mit CEA beschäftigt, stammt von Wittekind et al. (1984). Sie ist zum gleichen Zeitpunkt vorgetragen worden, wie die Ergebnisse der ei-

genen Arbeit (Nathrath, Meyer, Bassermann, 1984). Das Ergebnis dieser Untersuchungen von Wittekind berichtet über 38 positive Fälle von insgesamt 48 Untersuchungen primärer Mammacarcinome (77 %), die Lymphknotenmetastasen waren in 34 der 48 Fälle (71 %) positiv. Eine Differenz in der Positivität in Primärtumoren und den Metastasen ist also bei den unterschiedlichen Prozentwerten ersichtlich. Unsere eigenen Ergebnisse eines solchen Vergleichs für CEA zeigten, daß von 40 Fällen bei den Primärtumoren 22 (55 %) negativ und 18 (45 %) positiv waren. Von den 22 negativen Primärtumoren hatten aber nur acht negative Lymphknotenmetastasen. Umgekehrt fanden sich bei den 18 positiven Primärtumoren nur 15 positive Metastasen (s. Tab.XIV).

Der Vergleich dieser Zahlenwerte ergibt, daß für die positiven Reaktionsausfälle in Metastasen sich unsere Ergebnisse mit denen von Wittekind etwa decken, dagegen sind die vergleichend untersuchten Primärtumoren in unseren eigenen Ergebnissen wesentlich niedriger positiv, nämlich 45 %. Auch hierfür ist die Frage zu stellen, wieweit die Nichtabsorption gegenüber NCA für die Unterschiede bedeutungsvoll ist, wobei uns keine Untersuchungen bekannt sind, die etwa über den Gehalt von NCA in Primärtumor und Metastasen Auskunft geben.

Untersuchungen über das vergleichende Vorkommen von TPA in Primärtumoren und Metastasen sind in der Literatur nicht zu finden. Die eigenen Ergebnisse zeigten positiven Reaktionsausfall für TPA in allen 40 untersuchten Primärtumoren, in guter Übereinstimmung mit Björklund (1982). Zusätzlich zeigten alle Metastasen dieser Primärtumoren positive Reaktion (100 %) (s. Tab. XV). Völlig negative Fälle kamen nicht vor. In 17 Fällen (42,5 %) war in den Metastasen eine Zunahme der Farbreaktion gegenüber dem Primärtumor, in nur vier Fällen (10 %) war eine Verminderung der Farbreaktion festzu-

stellen. Noch zu Beginn der hier vorliegenden Untersuchungen 1982 war die tatsächliche Bedeutung von Tissue Polypeptid Antigen-TPA nicht eindeutig klar. Wie in der Einleitung dargestellt, stellte sich dann aber sehr bald durch die oben zitierten Arbeiten von Nathrath und den biochemischen Arbeiten von Weber et al. heraus, daß TPA zur Gruppe der Cytokeratine gehört. Ebenso ist in der Einleitung dargestellt worden, daß Mammacarcinome in den bisher untersuchten Fällen immer einen positiven TPA-Nachweis erbrachten, allerdings ist in der Einleitung ebenfalls dargestellt, daß bisher keine exakten Vergleiche mit der jeweiligen Histologie der Mammacarcinome vorgenommen wurden, keinerlei Arbeiten liegen über eine vergleichende Untersuchung mit den Mamma-zugehörigen Lymphknotenmetastasen vor.

Wie in den Ergebnissen dargestellt, findet sich auch in der vorliegenden Untersuchungsreihe in allen Primärtumoren eine positive Reaktion für TPA. Deutliche Unterschiede aber konnten im Reaktionsausfall (Färbintensität) innerhalb der einzelnen Tumoren festgestellt werden.

Mehrere wichtige Ergebnisse, wie oben dargestellt, sollen hervorgehoben werden.

Im Unterschied zu CEA sind TPA-Tumornekrosen regelmäßig negativ (s. Abb.12 und Abb.13).

Seit der Erkenntnis, daß TPA ein Cytokeratin ist, ist dieser Befund nicht mehr erstaunlich, weil bei der Zellnekrose offenbar auch die Antigenreaktivität dieser Cytoskelettstruktur verloren geht (s. Abb.5). Besonders auffällig, daß einzeln invadierende Tumorzellen an der Invasionsfront eine besonders intensive, kräftige TPA-Reaktion intracytoplasmatisch oder an der Cytoplasmamembran zeigen (s. Abb.6 und Abb.7). Im Unterschied hierzu können in soliden Tumorzellkomplexen bei festem Zellkontakt, vor allem zentral gelegene Tumorzellen, TPA-negativ sein.

Die zellulären Reaktionsmuster werden in einer kurz vor Abschluß dieser Arbeit erschienenen Untersuchung mög-

licherweise erklärbar. Gabbert (1985) konnte nämlich zeigen, daß die Intermediärfilamente Actin und Myosin im Elektronenmikroskop im Tumorzentrum parallel zur Cytoplasmamembran angeordnet sind. Diese Beobachtung würde unserem "membranösen" Typ genau entsprechen. Die von uns beobachtete starke intracytoplasmatische Reaktion von einzelnen Tumorzellen an der Invasionsfront wäre möglicherweise damit zu erklären, das an der Invasionsfront diese Intermediärfilamente nur noch ungeordnet im Cytoplasma von Tumorzellen nachweisbar sind. Andererseits zeigt sich, daß mit drüsiger Differenzierung von Tumorzellen dieses Antigen nahe der Zelloberfläche an der luminalen Seite nachweisbar ist (Abb.2). Zellkontakt und zelluläre Organisation bei Drüsenformierung scheinen demnach mit einer cytoplasmatischen Orientierung dieses Cytoskelettmarkers für drüsige Zellen einherzugehen. Die Ähnlichkeit dieser cytoplasmatischen Orientierung zur normalen Organdifferenzierung ist auffällig und unterstreicht wohl die Bedeutung des TPA als mit der Differenzierung korreliertes Antigen. Derartige Zellen sind sowohl in Primärtumoren wie in Metastasen zu beobachten.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis, das in der Befunddarstellung niedergelegt ist, findet sich in der Differenz der Reaktionsintensitäten zwischen Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen. Es konnte nämlich gezeigt werden, daß die Tumorzellen in den Metastasen insgesamt eine etwas stärkere Reaktion aufweisen als in den Primärtumoren. Dies ist deshalb erstaunlich, weil eine gleichgerichtete Beobachtung für CEA (Abb.16 und 17), wie eben dargelegt, für TPA (Abb.8 und 9, 19 und 21) erhoben wurde. Daß das onkofetale Antigen CEA in Metastasen stärker auftritt, ist verständlich, daß gleiches aber für das Differenzierungsantigen TPA auch beobachtet wurde, war sehr überraschend. Wie dieser Befund zu deuten ist, wird am Schluß der Besprechung dargestellt. Ein weiteres

Ergebnis ist aber die Tatsache, daß, abgesehen von den oben geschilderten Befunden, weder in den Primärtumoren noch in den Metastasen eine Beziehung zwischen TPA-Reaktion und histologischer Gradbestimmung, Tumorstadium und histologischer Struktur herstellbar war.

Ausgangspunkt unserer eigenen Untersuchungen war die Überlegung, ob die vergleichende Untersuchung des CEA als onkofetalem Antigen und des TPA als Marker für Differenzierung bei Primärtumoren und zugehörigen Lymphknotenmetastase nicht möglicherweise einen gegenläufigen Trend erkennen läßt, so daß im Grundsatz unsere eigenen Untersuchungen als Beitrag zur Erforschung der Metastasen-Problematik gedacht waren. Es hätte durchaus nahegelegen, daß etwa die Tumorzellen, die vom Primärtumor abgelöst im Lymphknoten zur Metastase ausgewachsen sind, im Lymphknoten als Ausdruck einer geringeren Differenzierung einen höheren Gehalt an CEA zeigen, während umgekehrt TPA als Differenzierungsantigen im Primärtumor noch in höheren Quantitäten hätte auftreten können, als etwa in den Tumorzellen der Lymphknotenmetastasen. Dies ist aber, wie die Ergebnisse zeigen, überraschenderweise nicht der Fall und auch die Ergebnisse von Wittekind, die sich allerdings nur auf CEA beziehen, zeigen keinen signifikanten Unterschied in der von uns ursprünglich erwarteten Richtung. Das Ergebnis, das sich bereits frühzeitig bei den eigenen Untersuchungen abzeichnete, war um so erstaunlicher, als zu dieser Zeit die Untersuchung von Fidler und Poste allgemein bekannt und anerkannt wurden, in denen am Modell des experimentellen Hamstermelanoms gezeigt wurde, daß nur bestimmte Zellen des Primärtumors, wenn sie in die Blutbahn gelangen, in der Lage sind, Metastasen zu erzeugen, in Bestätigung der bereits von zahlreichen Autoren früher festgestellten Tatsache, die Weiss treffend dahingehend charakterisiert hat, daß Millionen von Tumorzellen in die Blutbahn gelangen und dort untergehen und nur wenige Tumorzellen

über jene Eigenschaften verfügen, die Tumorzellen benötigen, um nach Verschleppung und Tumorzellarrest auch tatsächlich zur Metastase auszuwachsen.

Soweit es in den Arbeiten von Fidler und Poste gelungen ist, die Eigenschaften dieser metastasenfähigen clonogenen Tumorzellen näher zu charakterisieren, zeigt sich, daß es sich hierbei um die metastasentüchtigsten Tumorzellen handelt, so daß das Schlagwort der Selektion "survival of the fittest" zu einem Standardbegriff der Metastasenforschung geworden ist. Daß die Verhältnisse wesentlich komplizierter sind, ist in den darauffolgenden Jahren näher analysiert worden. Vor allem die Untersuchungen von Rabes (1984) über die Proliferationskinetik bei der Metastasenbildung haben sehr klar gezeigt, daß zwischen den verschleppten, metastasierungsfähigen Tumorzellen und der nachfolgend letztlich entstandenen Makrometastase eine Fülle von Teilphasen existieren, die teils mit hoher Proliferation und damit undifferenzierten Zellphasen einhergehen, teils aber mit Ruhephasen, in der verschleppten Tumorzellen bei nur geringem Wachstum alle Möglichkeiten der zellulären Differenzierung besitzen. Rabes konnte deshalb aufgrund der sehr detaillierten Analysen im Experiment zeigen, daß also zuerst clonogene Tumorzellen vorliegen, die nach Tumorzellarrest auswandern, wobei der entscheidende Punkt ist, daß nach unterschiedlichen Wachstumsphasen am Schluß die entstandene Makrometastase mit ihrem Wachstum und ihrer Gefäßversorgung sich gemessen an den Wachstumsparametern praktisch wie der Primärtumor verhält. In der vorliegenden Untersuchung sind aber nur Makrometastasen mit ihren zugehörigen Primärtumoren verglichen worden. Es ist also nicht erstaunlich, daß, unbeschadet der modellhaften Richtigkeit der Ergebnisse von Fidler und Poste, wir in unseren Untersuchungen bei den angewendeten Markern ein Verhalten finden, das etwa dem des Primärtumors entspricht.

Eine jüngst erschienene Untersuchung von Sharkey (1985) beschäftigt sich mit dem gleichen Problem und zwar an dem gleichen Untersuchungsobjekt, nämlich Mammacarcinom und Lymphknotenmetastasen.

In einer ausführlichen morphometrischen Analyse wird auch in dieser Arbeit dargelegt, ebenso wie wir das für TPA und CEA gefunden haben, daß kein faßbarer Unterschied zwischen den Primärtumoren der Mamma und den zugehörigen axillären Lymphknotenmetastasen besteht.

Die Frage stellt sich natürlich, ob bei unseren heutigen Kenntnissen - die neuen Erkenntnisse sind alle erst in den letzten Jahren gewonnen worden - der ursprüngliche Denkansatz eines Unterschieds zwischen Primärtumor und Metastasen grundsätzlich falsch war. Dem ist entgegenzuhalten, daß es in der menschlichen Pathologie immer wieder Beobachtungen gibt, wo aus einem relativ gleichförmig differenzierten Primärtumor Metastasen in Lymphknoten entstehen, die durchaus unterschiedliche Differenzierungskompartimente zeigen, so daß z.B. solide Carcinomkomplexe in Metastasen scharf abgegrenzt neben den drüsig differenzierten Tumorzellarealen vorkommen.

Derartige Beobachtungen sind zwar außerordentlich eindrucksvoll, aber in der Praxis relativ selten was sich daraus erklärt, daß eben in der Mehrzahl der Metastasen bezogen auf die Differenzierung ein dem Primärtumor so ähnliches Verhalten entwickelt wird, so daß sich z.T. bei noch unbekanntem Primärtumor aus den Lymphknotenmetastasen Rückschlüsse auf den möglichen Primärtumor und seine Differenzierung zumindest in einem Teil der Fälle ziehen lassen.

Eine besondere Besprechung bedarf aber aus den Ergebnissen die schwer zu interpretierende Beobachtung, daß, wie in den Ergebnissen dargestellt, sowohl die Intensität wie die Häufigkeit der Reaktionsausfälle sowohl

für CEA wie TPA im Primärtumor nicht ganz gleich sind, sondern, daß in den Metastasen häufiger eine stärkere Darstellung von TPA und CEA vorkommt als im Primärtumor.

Eine mögliche Deutung bietet sich an:

Zwischen Primärtumoren der Mamma und ihren Lymphknotenmetastasen besteht ein entscheidender Unterschied in der Tumorumgebung. Der große Bindegewebsreichtum der Mamma, in dem sich in typischer Weise das Carcinomwachstum des Primärtumors vollzieht, fehlt im Lymphknoten völlig. Möglicherweise bestehen deshalb erhebliche Unterschiede in der Ernährung der Tumorzellen im Primärtumor und den Lymphknotenmetastasen. Untersuchung über die Vaskularisation in den Lymphknotenmetastasen sind offenbar nach gründlicher Durchsicht der Literatur noch nicht durchgeführt worden; die Analyse von Angiogenese und Vaskularisation betreffen fast ausschließlich hämatogene Metastasen. Sie sind überwiegend jüngeren Datums und von Bassermann (1984) zusammenfassend dargestellt.

Ob nun die Angiogenese und damit die Ernährung für das Tumorzellwachstum und die Tumorzelldifferenzierung für Unterschiede zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastase verantwortlich sind, ist offen. Andere, organspezifische Einflüsse, könnten auch bei Lymphknotenmetastasen Bedeutung haben.

Vielleicht ist es naheliegend im Rahmen dieser Überlegungen zu vermuten, daß die Verhältnisse je nach Metastasenorgan erhebliche Unterschiede aufweisen. Daß diese Überlegung nicht abwegig ist, zeigt sich unseres Erachtens dadurch, daß ein Sachkenner wie L. Weiss (1985) für das Tumorzellverhalten in Metastasen ganz unterschiedliche Entwicklungsmöglichkeiten annimmt. Weiss kommt nämlich auf Grund seiner Studien zu drei möglichen Wegen, die letztlich die Unterschiede zwischen Primärtumor und Metastase erklären könnten (s. Abb.24).

Die eine Möglichkeit ist, daß vom Primärtumor stammende

metastasenfähige Subpopulationen permanent in Metastasen existieren. Die zweite Möglichkeit nimmt an, daß die metastasenfähigen Tumorzellen der Primärtumoren nur eine vorübergehende Metastasierungsfähigkeit besitzen und nach Metastasierung teilweise ausdifferenzieren, so daß nur eine kleine Subpopulation metastasenfähiger Tumorzellen zur Entstehung weiterer Metastasen führt.

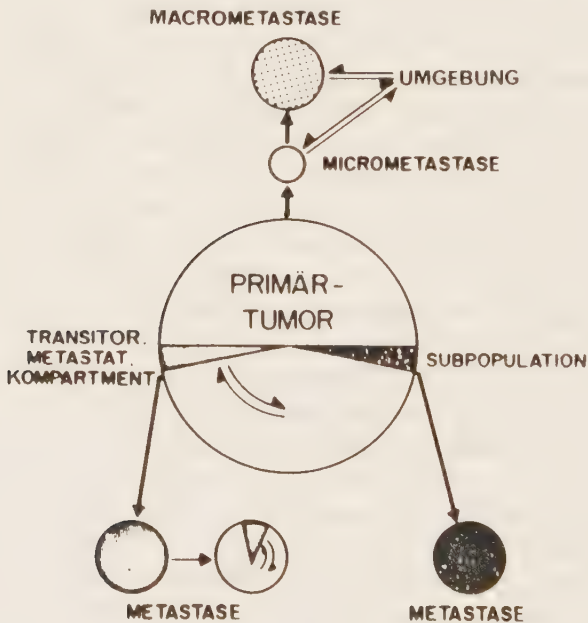


Abb.24: Drei mögliche Erklärungen für den hypothetischen Unterschied zwischen Tumorzellen in Primärtumoren und ihren Metastasen  
(Modifiziert nach Weiss 1985)

Die dritte Möglichkeit, die von Weiss angegeben ist, zeigt in entstandenen Makrometastasen weitgehende Ausdifferenzierungsvorgänge, die wesentlich von der jeweiligen Metastasen-Umgebung beeinflußt werden. Ordnet man diese Möglichkeit und Ergebnisse ein, so zeigt sich einerseits in den entstandenen Lymphknotenmetastasen ein weitgehend analoges Verhalten wie im Primärtumor, entsprechend dem Modellfall Nummer 2 von Weiss, andererseits aber, soweit Differenzen beobachtet werden, die Möglichkeit einer Umgebungsbeeinflußung in den Metastasen, wie sie Weiss als dritte Möglichkeit angibt.

Betrachtet man unter diesem Aspekt der Diskussion das Ergebnis der hier vorliegenden Untersuchung, so zeigt sich, wie viele letztlich sehr einfache Fragen, bei der Metastasenentstehung in Lymphknoten noch nicht geklärt sind. Vielleicht ist der wichtigste Beitrag, den die hier vorliegende Arbeit leisten kann, daß sich die Fragestellungen für zukünftige Arbeiten präziser stellen lassen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Der vorliegenden Untersuchung liegen 40 formolfixierte, paraffineingebettete Mammacarcinome und deren axilläre Lymphknotenmetastasen, die in chronologischer Reihenfolge der Jahre 1979 bis 1981 mit immunhistochemischen Methoden untersucht wurden, zugrunde.

Das Untersuchungsgut stammt aus dem Pathologischen Institut der Universität München. 36 invasive duktile und vier invasive lobuläre Mammacarcinome und deren Lymphknotenmetastasen wurden mit der indirekten Immunperoxidase-Methode in ihrem Reaktionsausfall mit den polyclonalen Antisera TPA und CEA (nach Absorption mit Lungen- und Milzextrakten) in Beziehung zur histologischen Struktur (WHO), Tumorstadium (pTNM) und histologischem Grad (Bloom) untersucht.

Beurteilt wurden in semiquantitativer Schätzung der Reaktionsausfall der Färbeintensität von Tumorzellen, die Homogenität bzw. Heterogenität der Färbeintensität innerhalb eines Tumors und das zelluläre Reaktionsmuster, das überwiegend intracytoplasmatisch und membranös kondensiert an der Cytoplasmamembran ausfiel.

Darstellung der Ergebnisse (gleichzeitig als Beantwortung der eigenen Fragestellung bei dieser Arbeit unter Abschnitt 1.4.)

1) Mit CEA war normales Mammagewebe in der Regel negativ, nur vereinzelt fand sich luminale Anfärbung (s. Abb.14). Von den 40 Primärtumoren waren 22 (55%) negativ, 18 (45%) positiv.

Von diesen 22 negativen Primärtumoren hatten nur 8 (20%) auch negative Lymphknotenmetastasen, die Metastasen der anderen 14 (35%) waren CEA-positiv (s. Abb.16 und Abb.17). Umgekehrt hatten von den 18 positiven Primärtumoren in den Metastasen nur drei Fälle ihr CEA verloren, während 15 Fälle in den Metastasen weiterhin positiv waren. Außer-

dem hatten in den Metastasen von 6 CEA-positiven Primärtumoren die Färbeintensität für CEA noch zugenommen (s. Abb.22 und Abb. 23).

In 16 Fällen (40%) stimmten die Metastasen in ihrer Färbintensität mit dem Primärtumor überein (s. Abb.18 und Abb.20).

CEA zeigte einen überwiegend negativen bzw. teilweise negativen Reaktionsausfall in Primärtumoren, in Metastasen zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung von homogenem und heterogenem zu negativem bzw. teilweise negativem Reaktionsausfall.

Das zelluläre Reaktionsmuster zeigte in den Metastasen häufiger eine diffuse intracytoplasmatische Reaktion als in den Primärtumoren, dort kam der "membranöse" Typ, die Polarisierung an den Zellpolen und die intracytoplasmatische Reaktion mit Kondensation am Cytoplasmarand etwa gleich häufig vor (s. Abb.15).

Beziehungen zur histologischen Struktur, Tumorstadium und histologischem Grad fanden sich bei keinem der untersuchten Parameter.

2) Mit TPA zeigten im normalen Drüsengewebe nur luminale Epithelien eine Reaktion mit Polarisation am oberen und unteren Zellpol (s. Abb.2).

Alle Primärtumoren (100%) und zusätzlich alle Fälle in den Lymphknotenmetastasen zeigten eine positive Reaktion (s. Abb.8 und Abb.9), völlig negative Fälle kamen nicht vor, aber innerhalb von Tumoren gab es negative Areale, außerdem Färbeintensitätsschwankungen innerhalb eines Tumors. Oft fand sich eine gleichmäßig positive Reaktion in den Lymphknotenmetastasen (s. Abb.9, Abb.10 und Abb.11). In 17 Fällen (42,5%) war in den Metastasen

eine Zunahme der färberischen Intensität gegenüber dem Primärtumor (s. Abb.3 und Abb.4), in nur 4 Fällen (10%) eine Verminderung festzustellen (s. Abb.19 und Abb.21).

TPA zeigte bei den Primärtumoren gleiche Zahl der Fälle mit Verteilung in homogene und teilweise negative Reaktion, in den Metastasen überwog der gleichmäßige positive (homogene) Reaktionsausfall.

Das zelluläre Reaktionsmuster ähnlich dem Reaktionsmuster in normalen Drüsengewebe zeigte sich auch im Primärtumor wie bei den jeweiligen Lymphknotenmetastasen bei Tumorzellen mit drüsiger Differenzierung (s. Abb.2). Diese Ähnlichkeit der cytoplasmatischen Orientierung sowie der offensichtliche Verlust der Cytoskelettstruktur in Zellnekrosen mit negativem TPA-Ausfall unterstreicht TPA als ein mit Differenzierung korreliertes Antigen, genauso wie die starke intracytoplasmatische Reaktion einzelner invadierender Tumorzellen (s. Abb.6).

Beziehungen zur histologischen Struktur, Tumorstadium und histologischem Grad fanden sich bei keinem der untersuchten Parameter.

3) Weder TPA noch CEA korrelierten in ihrem Färbeverhalten mit der histologischen Struktur, dem Tumorstadium oder dem histologischen Grad. Alle Parameter wurden mit dem Student Test auf Signifikanz geprüft.

Tumorzellnekrosen oder nekrotische Areale, auch in Tumordrüsen gelegen, sind bei CEA positiv (s. Abb.12), bei TPA negativ (s. Abb.5 und Abb.13).

In der Mehrzahl der Fälle verhielten sich TPA und CEA sowohl in einzelnen Carcinomformationen als auch im Vergleich zwischen Primärtumor und Metastasen unterschiedlich voneinander in Farbeintensität, Homogenität bzw. Heterogenität innerhalb eines Tumors und in Beziehungen zu gleichen morphologischen Strukturen (s. Abb.18, 19, 20 und 21).

Bei dem Gesamtergebnis der Färbeintensitäten fällt auf, daß TPA gegenüber CEA immer um ein oder zwei Färbeintensitätsstufen stärker reagierte. Das bedeutet für die Anwendung, daß TPA als epitheliales Differenzierungsantigen wegen seiner meist stärkeren und gleichmäßigeren positiven Reaktion bei der Identifizierung von Carcinomzellen, einschließlich solcher eines lobulären Carcinoms (s. Abb.7), dem CEA eindeutig überlegen ist. Beide Antigene sind bei einem Teil der axillären Lymphknotenmetastasen intensiver bzw. gleichmäßiger positiv als in Primärtumoren. Die vorliegenden Ergebnisse wurden anhand der heutigen Vorstellung in der Metastasenforschung diskutiert. Die von Weiss aufgestellten Hypothesen der Metastasenentstehung (s. Abb.24) wurden mit unseren Ergebnissen in Beziehung gesetzt, wobei sich ein weitgehend analoges Verhalten der Lymphknotenmetastasen zu den Primärtumoren zeigt, andererseits aber durch Umgebungseinflüsse bei Lymphknotenmetastasen Differenzen zwischen Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen möglich sind.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

Azzopardi J.G.:

Problems in breast pathology.

Saunders Company, London, Vol. II, 1979

Bassermann R.:

Angiogenese und Vaskularisation in Metastasen.

Verh. Dtsch. Ges. Path. 68, 124, 1984

Bauer J.:

Vergleichende Untersuchungen des Gehalts an karzino-embryonalem Antigen (CEA) in karzinomatösen und nicht-karzinomatösen menschlichen Geweben und seine Relation zu klinischen Parametern.

Pathologe 6, 298, 1985

Bergroth V., Reitamo S., Konthinen Y.T.:

Fixation-dependent cytoplasmic false-positive staining with an immunoperoxidase method.

Histochemistry 73, 509, 1982

Bloom H.J.G., Richardson W.W.:

Histological grading and prognosis in breast cancer.

Br. J. Cancer 11, 359, 1956/57

Björklund B., Björklund V.:

Antigenicity of pooled human malignant and normal tissues by cyto-immunological technique: presence of an insoluble, heat-labile tumor antigen.

Int. Arch. Allergy 10, 153, 1957

Björklund B.:

TPA in human cancer defense responses: immunologic and pathologic aspects.

Friedman F., Escobar M.R., Plenum, New York, 357, 1976

Björklund V., Björklund B.:

Localization of synthesis of TPA in normal and malignant human tissues by immunohistological techniques.

Petters Ed.: Protides of the biological fluids.

Pergamon press, Oxford, 229, 1979

Björklund B., Björklund V.:

Localization of TPA.

Medical Oncology Soc., 1979

Björklund B.:

On the nature and clinical use of TPA.

Tumor Diagnostik 1, 9, 1980

Björklund B.:

TPA: review and recent progress.

Critical Evaluation of tumor markers.

Contr. Oncol. 7, 73, 1981

Björklund V., Björklund B., Wittekind C., von Kleist S.:

Immuno-histochemical localization of TPA and CEA in breast cancer.

Acta path. microbiol. immunol. scand. Sect. A, 90, 471, 1982

Böcker, W.:

Immunohistochemical demonstration of CEA in 120 mammary carcinomas and its correlation with tumor type, grading, staging, plasma-CEA, and biochemical receptor status.

Path. Res. Pract. 180, 490, 1985

Bourne J.A.:

Handbook of immunoperoxidase staining methods.

Immunochemistry Laboratory 1983, DAKO Corporation, USA

Boyse, E.A., Old L.J.:

Some aspects of normal and abnormal cell surface genetics.

Ann. Rev. Genet. 3, 269, 1969

Burns J.:

Background staining and sensitivity of the unlabelled antibody-enzyme (PAP) method. Comparison with the peroxidase labelled antibody Sandwich method using formalin fixed paraffin embedded material.

Histochemistry 43, 291, 1975

Burtin, P. Chavanel G.:

A new and fast method of preparation of CEA.

Ann. Immunol., 1972

Burtin B., Gold P.:

Carcinoembryonic Antigen.

Scand. J. Immunol. 8, 27, 1978

Caseltz J., Osborn M., Seifert G., Weber K.:

Intermediate-sized filament proteins (Prekeratin, Vimentin, Desmin) in the normal parotid gland and parotid gland tumors.

Virchows Arch. (Pathol. Anat.) 393, 273, 1981

Chu T.M., Nemoto T.:

Evaluation of CEA in human mammary carcinoma.

J. Nat. Cancer Inst. 51, 1119, 1973

Coligan J.E., Schnute W.C., Egan M.L.:

The chemistry of CEA.

Cancer 36, 2445, 1975

Coons A.M., Creech M.H., Jones R.N.:

Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 47, 200, 1941

Coons A.M., Leduc E.M., Connolly J.M.:

Studies on antibody production. I A method of the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit.

J. Exp. Med. 102, 49, 1955

Eder M.:

Die Metastasierung: Fakten und Probleme aus humanpathologischer Sicht.

Verh. Dtsch. Ges. Path., 68, 1, 1984

Falkson M.C., Van der Watt J.J., Portugal M.A., Pitout M.J., Falkson G.:

CEA in patients with breast cancer.

Cancer 42, 1308, 1978

Fidler I.J., Gerstein D.M., Riggs, C.W.:

Relationship of host immune stages to tumor cell arrest, distribution, and survival in experimental metastasis.

Cancer 40, 46, 1977

Fidler I.J., Kripke M.:

Metastasis from preexisting variant cells within a malignant tumor.

Science 197, 893, 1977

Fidler I.J.:

Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis.

Cancer Research 38, 2651, 1978

Fidler I.J., Hart I.R.:

Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications

Science 217, 998, 1982

Fidler I.J., Poste G.:

The biological diversity of cancer metastases.

Hosp. Ract. 57, 1982/7

Fritz P., Wegner G., Braun C.:

Immunohistochemie: Theoretische Möglichkeiten, praktische Anwendung.

Zbl. allg. Pathol. u. pathol. Anat. 130, 187, 1985

Gabbert H., Wagner R., Moll R.:

Tumordifferentiation: an important step in tumor invasion.

Clin. Expl. Metastasis 3, 4, 257, 1985

Geisler, N., Weber K.:

The amino acid sequence of chicken muscle desmin provides a common structural model for intermediate filament proteins.

EMBO J. 1, 1649, 1982

Geisler N., Kaufmann G., Fischer S., Weber K.:

Intermediate filament proteins.

Embo J. 2, 12985, 1983

Gold P., Freedman S.:

Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques.

J. Exp. Med. 121, 439, 1965

Gold P., Freedman S.:

Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system.

J. Exp. Med. 122, 467, 1965

Gold P., Shuster J., Freedman S.:

CEA in clinical medicine.

Cancer 42, 1399, 1978

Goldenberg D.M., Sharkey R.M., Primus F.J.:

CEA in histopathology: Immunoperoxidase staining of conventional tissue sections.

J. Natl. Cancer Inst. 57, 11, 1976

Goldenberg D.M., Sharkey R.M., Primus F.J.:

Immunocytochemical detection of CEA in conventional histopathology specimens.

Cancer 42, 1546, 1978

Goldenberg D.M., Neville H.M., Carter H.C.:

CEA. Its role as a marker in the management of cancer.

J. Cancer Res. Clin. Oncol. 101, 239, 1981

Graham R.C., Lundholm U., Karnovsky M.J.:

Cytochemical demonstration of peroxidase activity with 3-amino-9-ethylcarbazole.

J. Histochem. Cytochem. 13, 150, 1965

Graham R.C., Karnovsky M.J.:

The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by a new technique.

J. of Histochemistry and Cytochemistry 14, 291, 1966

Haagensen D.E. et al.:

Evaluation of CEA as a plasma monitor for human breast carcinoma.

Cancer 42, 1512, 1978

Hammerström S. et al.:

Nature of tumor-associated determinat(s) of CEA.

Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 4, 1528, 1975

Hansen M.J., Snyder J., Miller E.:

CEA assay. A laboratory adjunct in the diagnosis and management of cancer.

Hum. Path. 5, 139, 1974

Harris M., Howell A., Chrissoshou M.:

A comparison of the metastatic pattern of infiltrating lobular carcinoma and infiltrating duct carcinoma of the breast.

Br. J. Cancer 50, 23, 1984

Heyderman E., Neville A.M.:

A shorter immunoperoxidase technique for the demonstration of CEA and other cell products.

J. Clin. Path. 30, 138, 1977

Holyoke E.D., Chu T.M.:

Tissue Polypeptid Antigen in: Immunodiagnosis of Cancer.

(Heberman R.B., McIntire K.R., eds.) New York, Marcel Dekker, 513, 1979

Jakesz R., Kolb R., Reiner G.:

The relationship between CEA-serum level and CEA-content in tumors of the human breast.

Carcino-embryonic Proteins, Vol. II, Ed. F.G. Lehmann, Elsevier, North Holland, Biomedical Press, 1979

Kjellgren K.:

The prognostic significance of consecutive determinations of serum TPA in human breast cancer.

Carcino-embryonic Proteins, Vol. II., Ed. F.G. Lehmann, Elsevier, North Holland, Biomedical Press, 1979

von Kleist S., Burtin P.:

Isolation of a fetal antigen from human colonic tumors. Cancer Res. 29, 1961, 1969

von Kleist S., Chavanel G., Burtin P.:

Identification of an antigen from normal human tissue that crossreacts with CEA.

Proc. Nat. Acad. Sci. 69, 2492, 1972

von Kleist S.:

Substances immunologically related to CEA.

Ann. Immunol (Inst. Pasteur) 124, 589, 1973

von Kleist S., Troupel S., King M., Burtin P.:

A clinical comparison between non-specific cross reacting antigen and CEA in patient's sera.

Br. J. Cancer 35, 875, 1977

von Kleist S.:

Die Bedeutung biologischer Tumormarker am Beispiel des CEA.  
Verh. Dtsch. Krebs Ges. 2, 283, 1979

von Kleist S., Wittekind S.C., Polack M., Gropp M., Sand-  
ritter W.:

Serum and tissular CEA in benign and cancerous lesions.  
Arch. Gewchw.forsch. 51, 523, 1981

von Kleist S., Wittekind C., Sandritter W., Gropp M.:

CEA positivity in sera and breast tumor tissues obtained  
from the same patients.

Path. Res. Practice 173, 390, 1982

Lamerz R., Fatch-Moghadam A.:

II. Carcinofetale Antigene.

Klin. Wschr. 53, 403, 1975

Lamerz R., Leonhardt A., Ehrhart M., v. Lieven M.:

CEA as a monitor of metastatic breast cancer.

Carcino-embryonic Proteins, Vol. II., Ed. F.G. Lehmann,  
Elsevier, North Holland, Biomedical Press, 1979

Lamerz R., Leonhardt A., Ehrenhardt M.:

Serial CEA determinations in the management of metastatic  
breast cancer.

Oncodev. Biol. Med. 1, 123, 1980

Laurence D.J.R., Stevens U., Bettelheim R.:

Role of plasma CEA in diagnosis of gastrointestinal, mam-  
mary, and bronchial carcinoma.

British Medical Journal 3, 605, 1972

Lo Gerfo P., Krupey J., Hansen M.J.:

Demonstration of an antigen common to several varieties of  
neoplasia.

New England Journal of Medicine 138, 1971

Löhrs U., Baretton G., Nathrath W.B.J.:

Untersuchungen an Kleinzelltumoren zum immunhistochemischen Nachweis von TPA.

Verh. Dtsch. Ges. Path. 67, 702, 1983

Lüning B., Wiklund B., Redelius P., Björklund B.:

Biochemical properties of TPA.

Biochimica et Biophysica Acta. 624, 90, 1980

Lüthgens M., Schlegel G.:

CEA + TPA in der klinischen Tumordagnostik, insbesondere des Mamma-Karzinoms.

Tumor Diagnostik 2, 63, 1980

MacSween J.M., Warner N.L., Bankhurst A.D.:

Carcinoembryonic antigen in whole serum.

Br. J. Cancer 26, 356, 1972

Mansour E.G., Hastert M., Park U., Petreli M.:

Immunohistochemical localization of CEA in breast cancer tissue with serum values and pathology.

Ann. Ass. Cancer Research 21, 193, 1980

Menendez-Botet C., Oettgen M.:

A preliminary evaluation of TPA in Serum or urine (or both) of patients with cancer or benign neoplasms.

Clin. Chem. 24, 868, 1978

Mesa-Tejada R., Pascal R.P., Fenoqlio C.M.:

Immunoperoxidase: a sensitive immunohistochemical technique as a "special stain" in the diagnostic pathology laboratory.

Human Pathology 8, 313, 1977

Miyazaki T. et al.:

Immunological similarity of NCA in feces with  $\alpha_1$ -acid glycoprotein.

Clinica Chimica Acta. 122, 161, 1982

Moll R., Franke W.W., Schiller D.L., Geiger B., Kiepler R.:  
The catalog of human cytokeratins: patterns of expression  
in normal epithelia, tumors and cultured cells.  
Cell 31, 11, 1982

Mross K., Mross B.:  
Determination of TPA levels in breast cancer and controls.  
Klin. Wochenschr. 61, 461, 1983

Myers R.E., Sutherland D.J., Meakin J.W.:  
CEA in breast cancer.  
Cancer 42, 1520, 1978

Nagel G.A., Wander M.-E., Holtkamp W.:  
Prognosefaktoren beim Mammacarcinom.  
Beitr. Onkol. 22, 19, Karger, Basel, 1985

Nakane P.K., Pierce G.B.:  
Enzyme-labeled antibodies: preparation and application  
for the localization of antigens.  
J. of Histochemistry and Cytochemistry, 14, 929, 1966

Nap M., Klaske A., Fleuren G.J.:  
Cross-reactivity with normal antigens in commercial anti-  
CEA sera, used for immunohistology. The need for tissue  
controls and absorptions.  
Am. J. Clin. Pathol. 79, 25, 1983

Nemoto T., Constantine R., Chu T.M.:  
Human TPA in breast cancer.  
J. Nat. Cancer Inst. 63, 6, 1347, 1979

Nathrath W.B.J., Wilson P.D., Trejdosiewicz L.K.:  
Immunohistochemical demonstration of epithelial and uro-  
thelial antigens.  
Acta histochem. (Suppl.) 25, 73, 1982

Nathrath W.B.J., Heidenkummer P., Arnholdt M., Bassermann R., Löhrs U., Permanetter W., Remberger K., Wiebecke B.:

TPA in normalem und neoplastischem Gewebe der Menschen.  
Verh. Dtsch. Ges. Path. 67, 701, 1983

Nathrath W.B.J., Meyer U., Lamerz R., Bassermann R.:

TPA und CEA in Mammacarcinomen und ihren axillären Lymphknotenmetastasen.

Verh. Dtsch. Ges. Path. 68, 100, 1984

Nathrath W.B.J., Heidenkummer P., Björklund V., Björklund B.:  
Distribution of TPA in normal human tissues: immunohistochemical study on unfixed, methanol-, ethanol- and formalin-fixed tissues.

J. Histochem. Cytochem. 33, 99, 1985

Neville A.M., Patel S., Capp M.:

The monitoring role of plasma CEA alone and in association with other tumor markers in colorectal and mammary carcinoma.

Cancer 42, 1448, 1978

Oehr P., Wustrow A., Derigs G., Bormann R.:

Evaluation and characterization of tumor-associated antigens by the inverse distribution function.

Tumor Diagnostik 2, 195, 1981

Ormerod M.G., Sloane J.P.:

Breast tumors.

Histochemistry in Pathology 21, 236, 1983

Primus F.J., Wang R.M.:

Detection of CEA in tissue sections by immunoperoxidase.

J. of Immunological Methods 8, 267, 1975

Primus F.J., Sharkey R.M., Hansen H.J.:

Immunoperoxidase detection of CEA.

Cancer 42, 1540, 1978

Primus F.J., Freeman J.W., Goldenberg D.M.:

Immunological heterogeneity of CEA: purification from meconium of an antigen related to CEA.

Cancer Research 43, 679, 1983

Rabes H.M.:

Die Zellkinetik der Metastasen.

Verh. Dtsch. Ges. Path. 68, 147, 1984

Reynoso G., Chu T.M., Holyoke D., Nemoto T.:

CEA in patients with different cancers.

JAMA 220, 361, 1972

Rogers G.T.:

Heterogeneity of CEA: Implications on its role as a tumor marker substance.

Biochimica et Biophysica Acta. 458, 355, 1976

Schaefer M.E., Fischer R.:

Der Peroxidasenachweis an Ausstrichpräparaten sowie an Gewebsschnitten nach Entkalkung und Paraffineinbettung.

Klin. Wschr. 16, 22, 1228, 1968

Schlegel G., Lüthgens M., Eklund G., Björklund B.:

Correlation between activity in breast cancer and CEA, TPA and eighteen common laboratory procedures and the improvement by the combined use of CEA and TPA.

Tumor Diagnostik 2, 6, 1981

Sharkey R.M., Primus F.J., Goldenberg D.M.:  
Comparison of the sensitivity of indirect antibody-con-  
jugated and the triple-bridge immunoperoxidase methods  
of immunohistochemical detection of CEA.  
Histochemistry 66, 35, 1980

Sharkey F.E., Greiner A.S.:  
Morphologic identity of primary tumor and axillary meta-  
stases in breast carcinoma.  
Arch. Pathol. Lab. Med. 109, 256, 1985

Shousha S., Lyssiotis T.:  
Correlation of CEA in tissue sections with spread of mam-  
mary carcinoma.  
Histopathology 2, 433, 1978

Shousha S., Lyssiotis T., Godfrey V.M.:  
CEA in breast-cancer tissue: a useful prognostic indica-  
tion.  
Br. Med. Journal 1, 777, 1979

Skryten A., Unsqaard B., Björklund B.:  
Serum TPA related to activity in a wide spectrum of cancer  
conditions.  
Tumor Diagnostik 3, 117, 1981

Sternberger L.A.:  
Immunocytochemistry.  
Willey and Sons, 2nd edn., 1979

Steward A.M., Nixon D., Zamcheck N., Aisenberg A.:  
CEA in breast cancer patients: serum levels and disease  
progress.  
Cancer 33, 1246, 1974

Taylor C.R., Burns J.:

The demonstration of plasma cells and other immunoglobulin-containing cells in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using peroxidase-labelled antibody.

J. Clin. Path. 27, 14, 1974

Taylor C.R.:

Immunoperoxidase techniques.

Arch. Path. Lab. Med. 102, 113, 1978

Thomsen D.M.P., Krupey J., Freedman S.:

The radioimmunoassay of circulating CEA of the human digestive system.

Proc. Nat. Acad. Sci. 64, 161, 1969

Tormey D.C., Waalkes T.P., Ahmann D., Gehrke C.W.,

Zumwatt R.W., Snyder J., Hansen M.:

Biological markers in breast carcinoma.

Cancer 35, 1095, 1975

Tormey D.C., Waalkes T.P., Snyder J.J.:

Biological markers in breast carcinoma.

Cancer 39, 2397, 1977

Tormey D.C., Waalkes T.P.:

Clinical correlation between CEA and breast cancer.

Cancer 42, 1507, 1978

UICC Committee

TNM-Klassifikation der malignen Tumoren

Springer Verlag, Berlin, 1979

Wagener C., Breuer M.:

Diagnostic significance and clinical application of tumor-associated antigens in man with special reference to the CEA.

J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 15, 529, 1977

Wagener C., Csaszar M., Totović V., Breuer M.:

A highly sensitive method for the demonstration of CEA in normal and neoplastic colonic tissue.

Histochemistry 58, 1, 1978

Wagener C., Hain F., Breuer M.:

Immunohistochemical demonstration of CEA in normal, transitional and inflamed colonic mucosa.

Oncodevelopmental Biology and Medicine 2, 331, 1981,

Elsevier, North Holland Biomedical Press

Wagener C., Hain F., Födisch H.-J.:

Localisation of CEA in embryonic and fetal human tissues.

Histochemistry 78, 1, 1983

Wahren B., Lidbrink E., Wallgren A.:

CEA and other tumor markers in tissue and serum or plasma of patients with primary mammary carcinoma.

Cancer 42, 1870, 1978

Wahren B., Lidbrink E.:

CEA content in mammary carcinoma cells.

Carcino-Embryonic Proteins, Vol. II., Ed.F. G. Lehmann,

Elsevier, North Holland, Biomedical Press, 1979

Walker R.:

Demonstration of CEA in human breast carcinomas by the immunoperoxidase technique.

J. Clin. Path. 33, 356, 1980

Wang D.Y., Bulbrook R.D., Hayward J.L., Hendricks J.C., Franchimont P.:

Relationship between plasma carcino-embryonic antigen and prognosis in women with breast cancer.

Europ. J. Cancer 11, 615, 1975

Weber K., Geisler N.:

The structural relation between intermediate filament proteins in living cells and the alpha-keratins of sheep wool.

EMBO J. 1, 1155, 1982

Weber K., Osborn M., Moll R., Wiklund B., Lünning B.:

TPA is related to the non-epidermal keratins 8, 18, 19 typical of simple and non-squamous epithelia: re-evaluation of a human tumor marker.

EMBO J. 3, 2707, 1984

Weiss, L.:

Principles of metastasis.

Academic Press, Inc., New York, 1985

Willis, R.A.:

The spread of tumors in the human body.

3. Ed. Butterworths & Co., 1973

Wittekind C., von Kleist S., Sandritter W.:

Comparative immunohistological studies on the localization of the CEA in benign and malignant mammary tissue.

Acta. Histochem. 25, 83, 1982

Wittekind C., Wachner R., von Kleist S.:

Immunhistologische Verteilungsmuster von CEA, SP-1 und HCG in primären Mammakarzinomen und deren axillären Lymphknotenmetastasen.

Verh. Dtsch. Ges. Path. 68, 97, 1984

World Health Organization

The World Health Organization histological typing of breast tumors - second edition.

Am. J. Clin. Pathol. 78, 806, 1982



## Lebenslauf

Name: Ulrike Meyer  
geboren: 25. September 1956  
in: Heidelberg  
Familienstand: ledig  
Konfession: ev.-luth.  
Eltern: Otto Meyer, wissenschaftlicher  
Assistent der Universität Heidelberg,  
Doktor der Medizin und  
Gisela Meyer, geb. Holzer

### Schulbildung:

1962 - 1966 Volksschule in Solingen  
1966 - 1975 August-Dicke Gymnasium, Solingen  
Juni 1975 Erlangung der Hochschulreife  
  
11/1975 - 8/1976 Sprachschulen Dante Alighieri und  
Institut Culturel Français, Rom

### Hochschulstudium der Medizin:

9/1976 - 6/1977 Université Claude Bernard, Lyon  
11/1977 - 1980 Universität zu Pisa  
11/1980 Universität zu Siena  
3/1981 Anerkennung des Physikums  
3/1981 Universität Düsseldorf  
5/1981-1985 Ludwig-Maximilians-Universität  
München  
  
März 1982 Ärztliche Prüfung, 1. Abschnitt  
März 1984 Ärztliche Prüfung, 2. Abschnitt  
März 1985 Ärztliche Prüfung, 3. Abschnitt  
Juni 1985 Approbation als Ärztin  
  
1. August 1985 Assistenstelle im Pathologischen  
Institut der Universität München



Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Bassermann für die Überlassung des Themas.

Zu besonderem Dank bin ich Herrn Prof. Dr. Eder verpflichtet für die stete Bereitschaft, mir bei auftretenden Fragen und Problemen Unterstützung zu geben.

Herrn Dr. Nathrath danke ich herzlich für die vielen Hinweise zur Methodik und zum Inhalt.

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Lamerz und Herrn Dr. Björklund für die Überlassung der Antiseren.





